

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIANE MARIA BACARO KLASSEN

**METILAÇÃO DO DNA E MARCAS DE HISTONAS
H3K4m3 E H3K27m3
EM INTRON REGULAM A EXPRESSÃO
DO GENE *MMP9* EM CÂNCER DE MAMA**

CURITIBA

2016

LILIANE MARIA BACARO KLASSEN

**METILAÇÃO DO DNA E MARCAS DE HISTONAS
H3K4m3 E H3K27m3
EM INTRON REGULAM A EXPRESSÃO
DO GENE *MMP9* EM CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Área de concentração : Patologia
Linha de pesquisa: Epigenética e Câncer
Orientadora: Prof^a. Dra. Giseli Klassen.
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Edneia A.S. R.
Cavalieri

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Klassen, Liliane Maria Bacaro

Metilação do DNA e marcas de histonas H3K4m3 e H3K27m3 em intron regulam a expressão do gene MMP9 em câncer de mama. / Liliane Maria Bacaro Klassen. – Curitiba, 2016.

86 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Giseli Klassen

Co-orientadora: Edneia A. S. R. Cavalieri

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas - Cancer 2. Metastase I. Título II. Klassen, Giseli III. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza Ramos IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.99249



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Metilação do DNA e marcas de histonas
H3K4m3 E H3K27m3 em íntron regulam a expressão
do gene *MMP9* em câncer de mama”**

por

Liliane Maria Bacaro Klassen

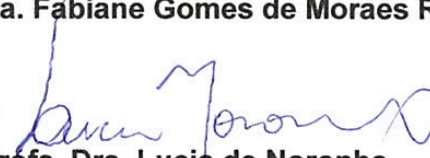
**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**


Profa. Dra. Giseli Klassen - Presidente


Profa. Dra. Juliana Inaba


Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante


Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego


Profa. Dra. Lucia de Noronha

Curitiba, 26 de agosto de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico essa Tese a minha Mãe, uma pessoa a qual minha vida se fez sentindo, pelas seus ensinamentos, sua dedicação, carinho e amor. Sempre ao meu lado em todas as horas, ruins ou boas, com todo companheirismo, sem igual. Meu espelho de luta e coragem. Meu amor eterno a você MÃE.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, representada pelo departamento de Patologia Básica, e ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, muito obrigada pela oportunidade, apoio na concretização desse trabalho.

A CAPES, CNPq, Fundação Araucária (Apoio ao Departamento Científico e Tecnológico do Paraná), pelos recursos financeiros aplicados na realização desse projeto.

À minha orientadora Prof. Dra. Giseli Klassen, pela oportunidade, pela dedicação e paciência. Obrigado por me ensinar a aquilo que tem de melhor, que é o amor pela pesquisa e a vontade de aprender cada dia mais. Com certeza sem a sua ajuda não teria conseguido. Meu eterno muito obrigado.

Agradeço a Dra. Edneia A. S. R. Cavallieri, por aceitar ser minha co-orientadora, sempre com muito carinho e boa vontade.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo apoio ao permitir a utilização do Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Aos colegas de laboratório de Epigenética: Graciele, Andressa, Mariana, Yara, Isabela, Isis e Luiz pelo apoio, companheirismo nessa caminhada de quatro anos, sem a ajuda de vocês com certeza a jornada teria sido muito mais difícil. Meu muito obrigado.

À banca examinadora Dra Fabiane Gomes de M Rego, Dra Adriana F Mercadante, Dra. Juliana Inaba e Dra Lucia Noronha pela disponibilidade e dedicação em avaliar esse trabalho contribuindo para o enriquecimento do mesmo.

Ao Valter A. Baura e Sra. Roseli Prado pela sua disponibilidade, paciência em ajudar em todas as dificuldades, agilizar as realizações de sequenciamento e com isto os resultados desse trabalho.

Aos alunos e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por dividir conosco os equipamentos e laboratórios, pela paciência e boa vontade em nos auxiliar quando necessário.

Ao Laboratório de Neurobiologia, do Departamento de Patologia, pela disponibilidade de equipamentos, e boa vontade de todos, alunos e professores em ajudar, obrigado.

Ao Laboratório de Nefrologia Experimental, do Departamento de Patologia, Professora Andreia E M Stinghen e seus alunos. Muito obrigado pela colaboração.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica, do Departamento de Farmácia, Professora Fabiane Rego e seus alunos, pela colaboração, muito obrigado.

À todos os colegas de mestrado e doutorado da turma de 2012, que contribuíram com aprendizado, dividindo experiências, partilhando conhecimentos, incentivos. Meu sincero muito obrigado.

A toda minha família que com apoio contribuíram para mais essa conquista, minha mãe, meu agradecimento eterno (Olga Baraniuk), meus irmãos (Douglas, Nereu e Paulo), cunhadas (Raynê e Giseli), sobrinhas (Amanda, Odette e Paula) e minha sogra (Iracy). Agradeço a compreensão nas horas de ausência e a paciência nas horas necessárias. Amo todos vocês, muito obrigado.

Aos amigos, que souberam compreender a jornada longa de dedicação e com isso muitas vezes a ausência necessária, muito obrigado.

EM ESPECIAL: Meu eterno e sincero agradecimento, pelo carinho, pela dedicação, parceria, incentivo, sem o teu apoio nada disso seria possível, meu amor, meu companheiro meu marido Rubens Klassen, amo você!

Ao meu filho amado, Gustavo Klassen por saber compreender a ausência, ter paciência para esperar a mamãe, muitas vezes ajudando, com sua tão pouca idade, amo você, muito obrigado. Vocês são a razão dessa vitória.

RESUMO

As metástases são a causa das mortes por câncer em 90% dos casos. No processo de metástases a destruição ou degradação da matriz extracelular é muito importante para o deslocamento das células tumorais malignas. Este processo é mediado por diversas enzimas, destacando-se a gelatinase B ou MMP-9. A epigenética estuda mecanismos de regulação da expressão gênica utilizando a metilação do DNA (em citosinas adjacentes a guaninas) e modificações pós-traducionais de histonas como principais mediadores. As ilhas de CpGs ao longo do promotor podem ser hipermetiladas e assim promover o silenciamento gênico e vice-versa. A partir deste conhecimento vem sendo utilizados diversos análogos de citosina a fim de inibir o processo de metilação de DNA. Nesse sentido esta em avançado estudo clínico o uso do 5-aza-2'-deoxicitosina (5-azadC) ou decitabine em alguns tipos de leucemias e doenças mielodisplásicas e provável início de utilização em tumores sólidos. Neste estudo o objetivo foi avaliar a expressão do gene *MMP9* em linhagens de câncer de mama e com esses dados estudar o efeito da metilação do DNA e modificações de histonas no promotor e corpo do gene com e sem tratamento com decitabine. Para isso clonamos e sequenciamos uma região contendo CpGs da região promotora do gene *MMP9* e também e ilhas de CpG no corpo do gene utilizando linhagens tumorais, PMC42, HeLa, MCF7 e MDA-MB-436. As linhagens MCF7 e MDA-MB-436 expressam baixos níveis de *MMP9*. Após o tratamento destas 5-azadC foi observado aumento da expressão do gene e proteína MMP-9. O sequenciamento de CpGs na região promotora revelou que a metilação do DNA regula a expressão deste gene nas linhagens tumorais. Além disso a análise em amostras tumorais de pacientes que expressam MMP-9 também possuem estes CpGs desmetilados. A região intragênica contém 4 ilhas de CpG que foram clonadas em 2 fragmentos e denominadas CGI1 e CGI2. A CGI1 é altamente metiladas com ou sem tratamento com decitabine nas linhagens tumorais. Por outro lado a CGI2 apresentou alguns CpGs nas posições 12 a 30 que estavam metilados nas linhagens tumorais sem tratamento com decitabine, e que são desmetiladas após o tratamento. Novamente os resultados de contrapartida com amostras de tumores primários, estes mesmos CpGs encontraram-se desmetilados nos tumores mais agressivos e com presença de MMP-9 na imunohistoquímica. Afim de se avaliar o provável envolvimento de modificações de histonas foi realizada a imunoprecipitação de cromatina para as marcas de cromatina para abertura H3K4me3 e fechamento H3K27me3. Utilizando a linhagem MCF7 observou-se que após o tratamento com decitabine houve o enriquecimento da marca de abertura na região promotora onde se ligam os fatores de transcrição AP1 e NFkB. Além disso os CpGs 12-30 da CGI2 também apresentaram aumento da marca de abertura. Em conjunto esses resultados mostram um provável novo mecanismo de regulação da expressão gênica através de CpGs localizados em íntron no gene *MMP9*. Esses resultados são importantes no contexto do entendimento de mecanismos de expressão de MMP-9 em câncer de mama e também para o estudo de possível efeito de ativação de metástases com o uso do medicamento decitabine.

ABSTRACT

Metastases are the cause of cancer deaths in 90% of cases. In the process of metastasis destruction or degradation of extracellular matrix it is important for the displacement of malignant tumor cells. This process is mediated by several enzymes, especially B-gelatinase or MMP-9. Epigenetic studies of regulatory mechanisms of gene expression using DNA methylation (adjacent cytosine to guanine) and post-translational modifications of histones as major mediators. The CpG islands along the promoter may be hypermethylated and thus promote gene silencing and vice versa. From this knowledge different cytosine analogues are used to inhibit the DNA methylation process. Accordingly this in advanced clinical study using 5-aza-2'-deoxycytosine (5-azadC) or decitabine in some types of leukemias and myelodysplastic diseases and probable beginning of use in solid tumors. In this study our goal was to evaluate the expression of *MMP9* gene in breast cancer cell lines and study the effect of DNA methylation and histone modifications in the promoter gene and intragenic region with and without treatment with decitabine. To this we have cloned and sequenced a region containing CpGs of the *MMP9* promoter region and CpG islands in the gene's body using tumor cell lines, PMC42, HeLa, MCF7 and MDA-MB-436. The lines MCF7 and MDA-MB-436 expressed low levels of *MMP9*. After treatment with 5-azadC was observed an increase in the gene expression and MMP-9 protein. The sequencing CpGs in the promoter region revealed that the DNA methylation regulates the expression of this gene in tumor cell lines. Further analysis of tumor samples from patients expressing MMP-9 also have these demethylated CpGs. The *MMP9* intragenic region contains 4 CpG islands that were cloned in two fragments and called CGI1 and CGI2. The CGI1 was highly methylated with or without treatment with decitabine in tumor cell lines. On the other hand CGI2 have showed some CpGs in positions 12 to 30 that were methylated in tumor cell lines without treatment with decitabine, and are demethylated following treatment. Again counterpart results with primary tumor samples, the same CpG were demethylated in more aggressive tumors of MMP-9 positive in immunohistochemistry. In order to evaluate the probable involvement of histone modifications was performed chromatin immunoprecipitation to chromatin marks for H3K4me3 H3K27me3 opening and closing respectively. Using the MCF7 it was observed that after treatment with decitabine was enriching the opening tag in the promoter region which bind transcription factors NFkB and AP1. Additionally the CpG 12-30 of CGI2 also increased too. Together these results showed a possible new mechanism for regulation of gene expression through CpGs located in intron in *MMP9* gene. These results are important in the context of understanding of MMP-9 expression mechanisms in breast cancer and also for the study of possible metastases activation with the use of decitabine drug.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Câncer, Câncer de mama e metástases	13
1.2. Epigenética	16
1.3. Metaloproteases de Matriz Extracelular (MMPs)	23
1.4. Proteína Metaloprotease-9 (MMP-9)	25
1.5. Proteína RECK	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Cultivo Celular	33
4.2. Avaliação do padrão de expressão do gene <i>MMP9</i> e <i>RECK</i> em linhagens tumorais de mama	33
4.3. Análise de metilação da região promotora de <i>MMP9</i> por digestão do DNA sensível a metilação	34
4.4. Clonagem e sequenciamento da CGI1, CGI2 e da região promotora do gene <i>MMP9</i>	34
4.5. Tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina e Tricostatin A	36
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	36
4.7. Análise de atividade da proteína MMP-9 por zimografia	37
4.8. Imunohistoquímica das Amostras de Tumores de mama	37
4.9. Imunoprecipitação de Cromatina da linhagem MCF7 – ChIP	38
4.10. Quantificação por qPCR após a imunoprecipitação cromatina	39
4.11. Declaração de Ética	39
4.12. Análise Estatística	39
5. RESULTADOS	42
5.1. Expressão do gene <i>MMP9</i> e <i>RECK</i>	42
5.2. Efeito de agente desmetilante e inibidor de HDAC sobre a expressão do gene <i>MMP9</i>	42
5.3. Expressão do gene <i>MMP9</i> em tumores de mama	43
5.4. Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene <i>MMP9</i> po digestão seguida de PCR	44
5.5. Clonagem da região promotora do gene <i>MMP9</i>	44
5.6. Clonagens das ilhas de CpG do gene <i>MMP9</i>	45
5.7. Imunoprecipitação de cromatina	45
5.8. Resultados suplementares	46
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTIMATIVA DO CÂNCER EM MULHERES NO BRASIL.....	14
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METILAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS.....	17
FIGURA 3. METILAÇÃO DO DNA MEDIADA POR DNAMETILTRANSFERASES (DNMTs).....	18
FIGURA 4. BALANÇO ENTRE ACETILAÇÃO E DESACETILAÇÃO DE HISTONAS.....	20
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MODIFICAÇÕES NAS HISTONAS.....	21
FIGURA 6. DOMÍNIO DE GRUPOS DE METALOPROTEINASE DE MATRIZ (MMPs).....	24
FIGURA 7. ESQUEMA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MMP9</i>	27
FIGURA 8. A ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA PROTEÍNA RECK.....	29
FIGURA 9. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE MMP-9 EM LINHAGENS TUMORAIS.....	48
FIGURA 10. COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP9</i> E <i>RECK</i> EM LINHAGENS TUMORAIS.....	49
FIGURA 11. EFEITO DE 5-azadC E TSA NA EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP9</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	50
FIGURA 12. EXPRESSÃO DOS GENES <i>MMP9</i> E <i>RECK</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA COM E SEM TRATAMENTO COM 5-azadC E TSA.....	51
FIGURA 13. IMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9 EM TUMORES DE MAMA.....	52
FIGURA 14. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO GENE <i>MMP9</i>	52
FIGURA 15. PERFIL DE METILAÇÃO DE CPGS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MMP9</i> EM LINHAGENS TUMORAIS.....	53
FIGURA 16. PERFIL DE METILAÇÃO DE CpGs NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MMP9</i> EM TUMORES DE MAMA.....	53
FIGURA 17. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI1 DO GENE <i>MMP9</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	54
FIGURA 18. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI2 DO GENE <i>MMP9</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	55
FIGURA 19. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI2 (CpG 12-30) DO GENE <i>MMP9</i> EM TUMORES DE MAMA.....	56
FIGURA 20. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI2 DO GENE <i>MMP9</i> COMPARANDO 5-azadC E TSA EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	57
FIGURA 21. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA.....	58
FIGURA S1. SEQUENCIAMENTO DA CGI1 E CGI2 DO GENE <i>MMP9</i> EM LINHAGEM PMC42.....	59
FIGURA S2. EFEITO DO TRATAMENTO DA LINHAGEM DE TUMOR CERVICAL HELA COM 5-azadC NA EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP9</i>	60
FIGURA S3. SEQUENCIAMENTO DA CGI1 E CGI2 DO GENE <i>MMP9</i> EM LINHAGEM HELA COM E SEM TRATAMENTO COM 5-azadC.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Iniciadores (qPCR) para avaliação da expressão do gene <i>MMP9</i> e <i>RECK</i> e imunoprecipitação de cromatina.....	40
TABELA 2. Iniciadores e as enzimas de restrição utilizadas para a região promotora do gene <i>MMP-9</i>	40
TABELA 3. iniciadores para clonagem e sequenciamento das CGI1, CGI2 e da região promotora do gene <i>MMP9</i>	41
TABELA 4. Caracterização dos tumores de mama.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

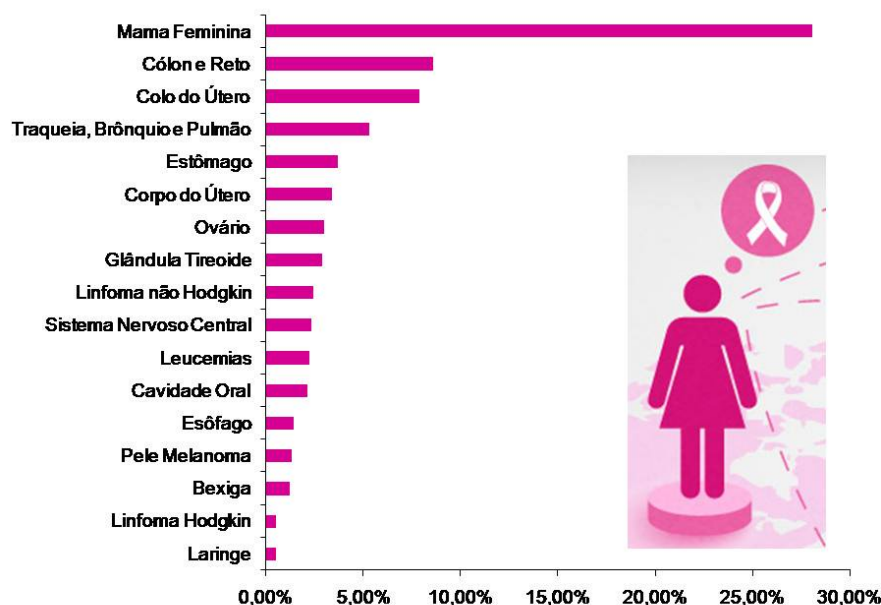
5-azadC: 5-aza-2'desoxicitidina
5mC: 5 metil citosina
AP-1: proteína ativação 1
CpG: Citosina-Fosfato-Guanina
CGIs - Ilhas de CpG intragênicas
DNMTs: Enzimas DNA metil-transferases
ESR1: Gene do receptor de estrogênio
FDA: do inglês Food and Drug administration
HAT: Enzima acetiltransferase
HDAC: Enzima histona desacetilase
HDI: inibidor específico para HDACs
HDMT: Enzima histona demetilases
HER2: do inglês, human *epidermal growth factor receptor type 2*
HMT: Enzima histona metiltransferase
IL-1: interleucina 1
INCA: Instituto Nacional do Câncer
miRNA: microRNA
MMP – metaloprotease de matriz
MMP-2: Metaloprotease de matriz 2
MMP-9: Metaloprotease de matriz 9
MT-MMPs: metaloprotease que possui domínios transmembrana
ncRNA: RNAs não codificantes
NFkB: fator nuclear kappa B
OMS: Organização Mundial da Saúde
PEA3: ligação da proteína de 3-local poliomavírus
PGR: Gene do receptor de progesterona
RB: Retinoblastoma
RE: Receptor de estrogênio
RECK – do inglês *Reversion inducing Cystein rich protein*
RNAs: Ácido ribonucleico
RP : Receptor progesterona
SAHA - ácido suberoil anilida hidroxamica
SAH - S-adenosil-L-homocisteína
SP-1: ligação de especificidade 1
TGFβ: fator transcrição de crescimento beta
TIMP - inibidor tecidual das metaloproteases
TNF: fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer, Câncer de mama e metástases

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células anormais que tem um potencial invasivo podendo resultar em morte. De acordo com as estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer e da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Uma estimativa mostra que até o ano 2030, o número será de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer (Globocan, 2012). No Brasil a estimativa de 2016/2017, é de que sejam registrados 596 mil novos casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres, 300.800. Podemos observar na Figura 1 a distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes nas mulheres a cada 100 mil habitantes (Inca, 2016).

O câncer é causado por diversos fatores externos, como o tabaco, organismos infecciosos, dieta pouco saudável, sedentarismo entre outros. Os fatores internos incluem as mutações genéticas herdadas, descontrolo hormonal e alterações no sistema imune, entre outros. Esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência para levar ao câncer. Segundo Hanahan e Weinberg (2011), existem alterações celulares comuns à maioria dos cânceres tais como (I) autossuficiência em fatores de crescimento, (II) insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento, (III) evasão das células à morte por apoptose, (IV) potencial replicativo ilimitado, (V) angiogênese sustentada (VI) invasão tecidual e metástase, (VII) reprogramação metabólica pela célula tumoral para suportar o contínuo crescimento e proliferação (VIII) a evasão ativa das células tumorais às células do sistema imune, (IX) inflamação (X) instabilidade genômica e mutações (Hanahan e Weinberg, 2011).

FIGURA 1. ESTIMATIVA DO CÂNCER EM MULHERES NO BRASIL

Fonte: adaptado de INCA (2016)

Distribuição proporcional dos dezessete tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para ano de 2016 (válido em 2017) em mulheres, exceto pele não melanoma, segundo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Inca). Taxa bruta de incidência a cada 100 mil mulheres.

Entre os diversos tipos de neoplasias, o câncer de mama é o que mais atinge as mulheres em todo mundo, e embora a taxa de cura deste câncer esteja aumentando nos países desenvolvidos, permanece em segundo lugar entre as neoplasias que levam a morte entre as mulheres (Malvezzi *et al.*, 2012). Entre as norte-americanas, se estima que 29% dos casos de câncer serão os de mama, chegando a uma taxa de morte de 15% (Park *et al.*, 2016). A maioria das mortes por câncer da mama não estão relacionadas ao tumor primário, mas sim com as metástases. As metástases são tumores secundários que se estabelecem ao longo do processo tumoral e são a causa das mortes por câncer em 90% dos casos, a partir de tumores sólidos (Weigelt *et al.*, 2005). Para o câncer de mama, os locais mais comuns para metástases são os ossos, pulmões, fígado e cérebro (Lee, 1983). Nos últimos anos a mortalidade em pacientes com câncer de mama tem diminuído, principalmente em países com altas taxas *per capita*. Essa variação tem a ver com o padrão de fatores de risco e, mais importante, com o acesso ao diagnóstico precoce e, posteriormente, a um tratamento adequado como, por exemplo, pelo uso da terapia sistêmica adjuvante (Desantis *et al.*, 2015). Porém, como ainda não é

possível determinar de modo seguro o risco das metástases, mais de 80% das pacientes com câncer de mama recebem terapia adjuvante, contudo, em metade dessas mulheres ocorre recidiva e morte devido às metástases (Weigelt *et al.*, 2005). Além disso, as metástases podem ser a causa de morte mesmo depois de décadas de remoção do tumor primário e da terapia adjuvante (Pantel e Brakenhoff, 2004). Este período de latência é devido a dormência das células tumorais em que a doença residual está presente mas não é clinicamente aparente (Pantel e Brakenhoff, 2004; Morrissey *et al.*, 2016).

No processo de estabelecimento das metástases a destruição ou degradação da matriz extracelular é muito importante para o deslocamento das células tumorais malignas. Este processo é mediado por diversas enzimas, destacando-se as metaloproteases de matriz (MMPs) (Stamenkovic, 2000). Informações obtidas da neoplasia como o tamanho do tumor, grau de diferenciação, a marcação de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) bem como a amplificação de *HER2*, as mutações de *BRCA1* e *BRCA2* e o número de linfonodos comprometidos são considerados úteis no diagnóstico do câncer de mama (Koboldt *et al.*, 2012). RE e RP são proteínas receptoras de hormônios estrógeno e progesterona respectivamente, e sua presença detectado após imunohistoquímica, indica bom prognóstico da doença e orientam o tratamento.

Os tratamentos das pacientes com diagnóstico de câncer de mama se estendem desde procedimentos cirúrgicos à quimioterapia, radioterapia e tratamentos com inibidores hormonais que seguem os padrões estabelecidos quanto à positividade dos receptores hormonais (Droog *et al.*, 2013; Hervouet *et al.*, 2013)

Para o câncer de mama como em outros tipos de câncer, o diagnóstico precoce faz toda a diferença, principalmente no tempo de sobrevida livre de doença e na mortalidade.

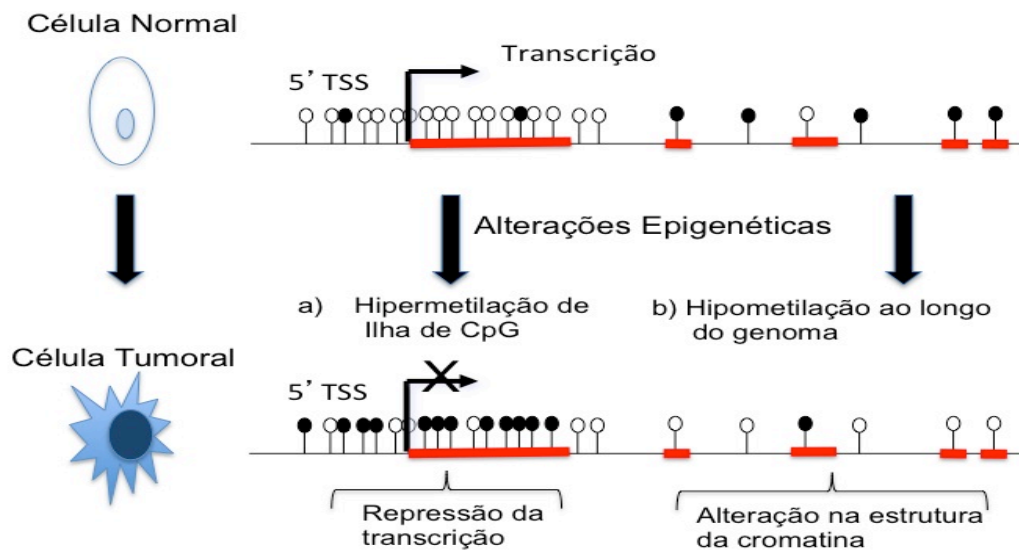
Sabe-se desde a década de oitenta a importância do entendimento dos eventos epigenéticos que ocorrem no câncer e que governam cada uma das etapas da doença.

1.2. Epigenética

A epigenética é descrita por eventos que alteram a expressão gênica sem alterações na sequência de DNA (Verma e Srivastava, 2002). A epigenética teve um crescimento exponencial de publicações na última década sendo apontada como importante fonte de novas terapias para o câncer (Hamm e Costa, 2015). Os mecanismos epigenéticos compreendem: a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não codificantes (Verma e Srivastava, 2002).

Entre as alterações epigenéticas a metilação do DNA é a mais bem estudada. A primeira evidência de alteração no perfil de metilação do DNA no genoma humano foi descrito em 1983, quando se observou que ocorria a hipometilação global do genoma em células cancerosas (Feinberg e Vogelstein, 1983). Este evento é considerado um marco no estudo da epigenética e do câncer, produzindo a partir de então grande interesse da comunidade científica mundial. A perda da metilação global no câncer ocorre principalmente em regiões repetitivas do genoma, regiões que contém retrotransposons, promotores pobres em CpG e íntrons, observados em vários tipos de câncer (Ehrlich, 2002). Apesar de ter sido observada a hipometilação global do genoma em células cancerosas, a hipermetilação em alguns locais muito específicos conduz ao silenciamento gênico e a um estado inativo da cromatina (Figura 2).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METILAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS



Fonte: Klassen, 2012.

Na célula normal as regiões ricas em CpG (ilhas de CpG) estão desmetiladas favorecendo a transcrição. As regiões contendo CpG ao longo de um gene são metiladas numa proporção que pode ser de 3 em cada 4 CpGs. Na célula tumoral podem ocorrer dois eventos que envolvem a metilação do DNA a) hipermetilação da ilha de CpG que tem como consequência a repressão da transcrição do gene e b) hipometilação global que altera a estrutura normal da cromatina, podendo conduzir às quebras cromossômicas. Os círculos brancos são CpGs desmetilados. Os círculos pretos são CpGs metilados. Em vermelho estão destacados os exons de um gene. 5'TSS é a região do início de transcrição localizada a 5' de um gene.

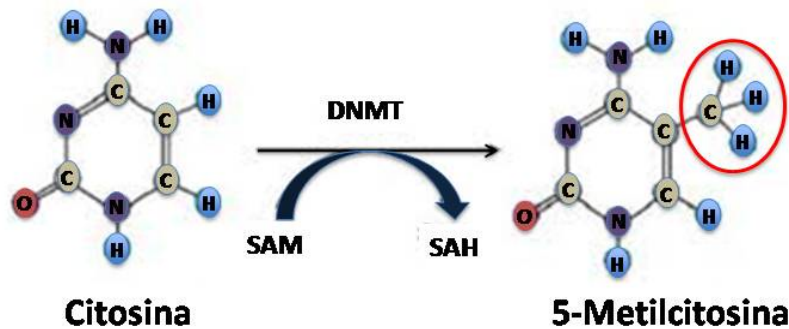
Este evento foi evidenciado pela primeira vez no estudo do gene da calcitonina em tumores pulmonares e linfomas (Baylin *et al.*, 1986). Logo a seguir foi observado o silenciamento por hipermetilação de um importante supressor de tumor, o gene do retinoblastoma – RB que controla o ciclo celular em um tumor raro de retina (Greger *et al.*, 1989).

A metilação do DNA é um processo complexo no qual um grupo de enzimas denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs), a partir do doador universal S-adenosilmetionina, que adicionam um grupo metil ao carbono na posição 5 de citosinas adjacentes a guaninas (no contexto 5'CG3') (Bestor, 2000) Figura 3. A família de proteínas DNMTs nos mamíferos é composta por DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L e a DNMT2 que catalisam metilação de RNA (Subramaniam *et al.*, 2014). A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (DNA hemimetilado) possibilitando que, durante a replicação ocorra a propagação do

padrão de metilação das fitas recém-sintetizadas (Williams *et al.*, 2012). Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas DNA metilases de *novo* DNMT3A e DNMT3B e são copiadas nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção (Yang *et al.*, 2001; Bird, 2002).

A metilação *de novo* leva ao silenciamento gênico em diversos tipos de câncer e pode ocorrer tanto através da atividade da DNMT1 quanto pela DNMT3A ou DNMT3B (Hatzia Apostolou e Iliopoulos, 2011).

FIGURA 3. METILAÇÃO DO DNA MEDIADA POR DNA METILTRANSFERASES (DNMTs)



Fonte: Gronbaek *et al.*, 2007

O grupo de enzimas DNMT catalisam a reação entre o S-adenosilmetionina (SAM) que doa o grupo CH₃ para o carbono 5 da desoxicitidina (destacada pelo círculo vermelho) gerando a 5-metilcitosina. SAH, S-adenosil-L-homocisteína.

Nos mamíferos a metilação do DNA ocorre predominantemente nos dinucleotídeos CpG (a letra p representa a ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos). Embora já tenha sido descrita a metilação em outros locais do DNA em células humanas (Woodcock *et al.*, 1987), até recentemente não foi encontrada uma função definida para a não CpG metilação (Patil *et al.*, 2014). Os dinucleotídeos CpGs quando presentes em quantidade 10 vezes maior do que no restante do genoma em uma região de cerca de 1 kb são denominadas ilhas de CpG (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). Essas regiões estão geralmente presentes no promotor e no primeiro éxon e ocorrem em mais da metade dos genes em humanos (Bird, 2002; Antequera, 2003). As ilhas de CpG não são exclusivamente localizadas em regiões promotoras, muitas delas podem ser encontradas no corpo dos genes (regiões intragênicas) (Delpu *et*

al., 2013). O genoma humano possui 27.537 mil ilhas de CpGs sendo que destas, 7,7% encontram-se no corpo do gene (Rademacher *et al.*, 2014).

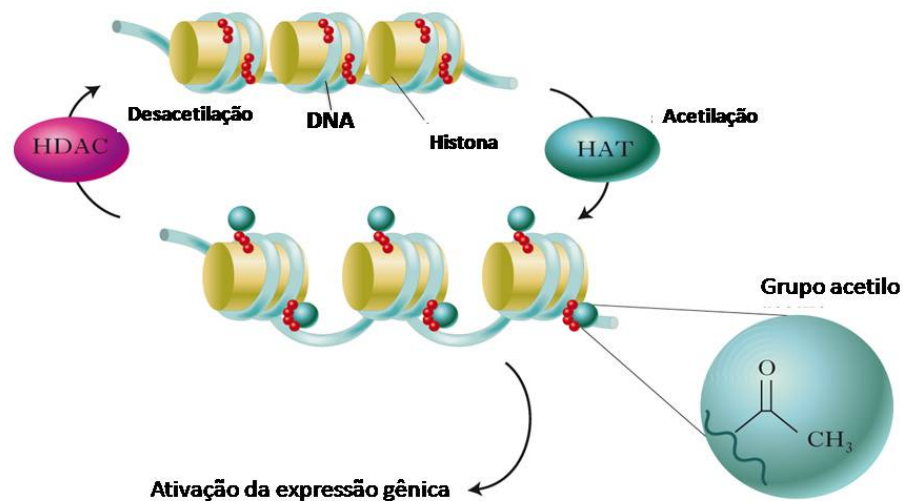
A importância da metilação das ilhas CpGs encontradas no corpo do gene vem sendo discutida com muito interesse na última década (Kulis *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado que os padrões de metilação nestas regiões desempenham um importante papel na regulação da transcrição gênica (Shenker e Flanagan, 2012). Recentemente, Shenker (Shenker *et al.*, 2015) utilizando uma linhagem de câncer de mama que possui o gene do receptor de estrógeno (*ESR1*) positivo e o promotor desmetilado, passou a silenciar *ESR1* por hipermetilação de uma região intragênica depois de tratamento com agente desmetilante inibidor de DNMT1.

A desmetilação do DNA tem sido um dos principais alvos de terapia conciliando-se com a epigenética. O uso do agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadC) também denominado decitabine e comercializado como Dacogen foi aprovado pelo FDA para o tratamento de síndrome mielodisplásica desde 2006 (Stresemann e Lyko, 2008). Este composto tem sido uma alternativa importante para o tratamento de leucemias em pacientes que não podem fazer transplante assim como em idosos (Wouters e Delwel, 2016). O decitabine por ser um análogo da citosina acaba sendo fosforilado e incorporado na síntese de DNA. Porém, a DNMT fica presa ao DNA quando se aproxima para copiar o padrão de metilação na nova fita, sendo em seguida degradada por mecanismos de reparo do DNA (Stresemann e Lyko, 2008).

Outro evento epigenético importante que também ocorre no desenvolvimento tumoral são as modificações das histonas (Verma e Srivastava, 2002; Momparler, 2003). Nos eucariontes os nucleossomos formam um elemento fundamental para o empacotamento do DNA. Aproximadamente 147 pares de base são enrolados em um octâmero de proteínas composto pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4, as quais estão localizadas no centro do nucleossomo. A cauda N-terminal das histonas tem sido relacionada com as diversas modificações pós-traducionais resultando em um grande número de fenótipos. A primeira alteração detalhada foi a acetilação, regulada pelas enzimas histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC) (Gronbaek *et al.*, 2007; Haberland *et al.*, 2009). Nessa modificação, quando resíduos específicos de lisina são desacetilados, ocorre o fechamento da

cromatina devido a interação das cargas positivas desses aminoácidos com a carga negativa do DNA (Gronbaek *et al.*, 2007) (Figura 4).

FIGURA 4. BALANÇO ENTRE ACETILAÇÃO E DESACETILAÇÃO DE HISTONAS



Fonte: adaptação [http://www.treccani.it/enciclopedia/epigenetica_\(Dizionario-di-Medicina\)](http://www.treccani.it/enciclopedia/epigenetica_(Dizionario-di-Medicina))

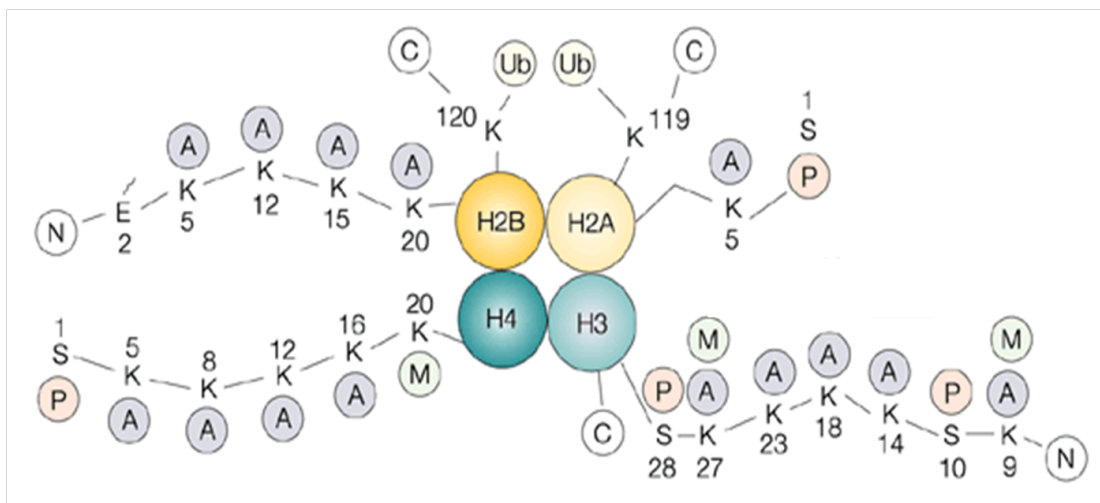
Modificações das histonas quanto a acetilação e desacetilação, regulada pelas enzimas histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC)

Outra modificação de destaque é a metilação de lisinas que pode ocorrer em três diferentes níveis através da substituição de hidrogênio na amina primária por monometilação (me1), dimetilação (me2) e trimetilação (me3) da histona H3 nas lisinas K4, K9, K14, K18, K23 e K27. Resumidamente, o que acontece é que a acetilação das lisinas pode promover o relaxamento da cromatina e a ativação transcricional por neutralizar as cargas positivas das histonas (Dion *et al.*, 2005), enquanto que a metilação têm sido associada tanto para os efeitos de ativação e inibição da transcrição dependendo da quantidade de grupos metil adicionados e de qual lisina recebe a modificação (Teperino *et al.*, 2013). Estas modificações são catalisadas pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e pelas histonas metiltransferases (HMTs), respectivamente. Enquanto as enzimas HATs e HMTs adicionam grupos acetil e metil, as histonas desacetilases (HDACs) e as histonas demetilases (HDMs) removem os grupos acetil e metil, nesta ordem (Gronbaek *et al.*, 2007; Haberland *et al.*, 2009). A alternância entre os grupos de modificações

inseridos nos diferentes resíduos de aminoácidos levou à formulação da hipótese de "código de histonas" que afirmam que as combinações específicas destas marcas e de outras tais como a ubiquitinação, fosforilação entre outras podem predizer o estado funcional da cromatina (Figura 5) (Turner, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Torres e Fujimori, 2015).

A cromatina é vista sob duas condições sendo a eucromatina acessível à maquinaria da transcrição, com marcas de acetilação em diferentes histonas tais como H3K9ac e H4K12ac (Hebbes *et al.*, 1988), e também marcas de metilação principalmente na H3K4me3 (Bernstein *et al.*, 2002). Já a heterocromatina, inacessível à transcrição, por outro lado, é tipicamente associada com marcas repressivas de metilação tais como a H3K27me3, H3K9me3 e H4K12me (Zhang *et al.*, 2001; Umlauf *et al.*, 2004).

FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MODIFICAÇÕES NAS HISTONAS



Fonte: [nature.com/nrc/journal/fig_tab/nrc1201-194a_F1.html](https://www.nature.com/nrc/journal/fig_tab/nrc1201-194a_F1.html)

As modificações pós-traducionais das histonas ocorrem principalmente na cauda N- terminal do núcleo de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e incluem: (A) acetilação, (M) metilação, (P) fosforilação, (Ub) ubiquitinação. Note que os resíduos de lisina (K9) e (K27) da H3 podem ser acetilado ou metilado. K, resíduo de lisina; S, serina; C, terminal carboxil; E, ácido glutâmico; N, no terminal amino; P, fosfato.

Os processos associados à redução da transcrição, ou ao fechamento da cromatina estão associados às HDACs que tem um papel fundamental na maquinaria de transcrição. As HDACs são um grupo de enzimas que removem

o grupo acetil a partir de resíduos de lisina. Existem pelo menos 18 HDACs identificadas em mamíferos e caracterizadas em quatro classes de acordo com suas sequências homólogas (Yang e Seto, 2007). As classes estão divididas em I, II, III e IV. A Classe I é composta pelas HDACs - 1, 2, 3 e 8; as de Classe II pelas HDACs - 4, 5, 6, 7, 9 e 10; as de Classe III que constituem a família – SIRT1-sirt7; e finalmente, as de Classe IV sendo seu único representante a HDAC 11 (Yoon e Eom, 2016).

O butirato foi o primeiro composto descrito como um inibidor não específico de HDACs capaz de produzir vários efeitos biológicos em culturas de células (Yoon e Eom, 2016). Um antibiótico antifúngico denominado de Tricostatin A ou TSA foi identificado como o primeiro inibidor específico para HDACs (HDI) sendo capaz de induzir a diferenciação celular (Yoshida *et al.*, 1990) e tornando-se uma importante estratégia terapêutica. O TSA é um HDI amplamente utilizado nas abordagens experimentais. Este composto inibe a ação de HDACs e causam mudanças seletivas em aproximadamente 2% dos genes. As HDAC2, HDAC3 e HDAC8 (classe I) são diretamente reguladas por este composto. O TSA é capaz de inibir a expressão da HDAC7, diminuir as das HDAC2, HDAC8 e HDAC10 e aumentar a expressão da HDAC3 (Duong *et al.*, 2008). Outro inibidor é Romidepsin nome comercial Istodax, é um ciclopeptídeo que foi aprovado pelo FDA em 2009, e a partir de então, outros inibidores de HDAC vem sendo testados, inclusive para tumores sólidos como câncer de pâncreas e câncer de mama, estando para o câncer de mama em fase III de testes clínicos com inibidor Entinostat (MS-275), e um inibidor de HDAC benzamida (Yoon e Eom, 2016).

O terceiro evento da epigenética está relacionado aos RNAs não codificantes (ncRNA), que são moléculas transcritas a partir do genoma, não traduzidas em polipeptídeos e tendo sua principal função a regulação da expressão gênica (Goldberg *et al.*, 2007). Assim como os genes codificantes de proteínas, os genes de RNA não codificantes são ativados por fatores de transcrição e transcritos pela RNA polimerase II (Bartel, 2004).

Os ncRNAs estão divididos em três grandes grupos em função de seu tamanho. O grupo dos microRNA (miRNA) compreendem moléculas muito pequenas com tamanho aproximado de 20 a 30 nucleotídeos. Já os RNA nucleolares pequenos (snoRNA) possuem tamanhos que variam de 60 a 300

nucleotídeos, enquanto os RNA não codificantes longos apresentam o tamanho médio de 2000 nucleotídeos (Goldberg *et al.*, 2007).

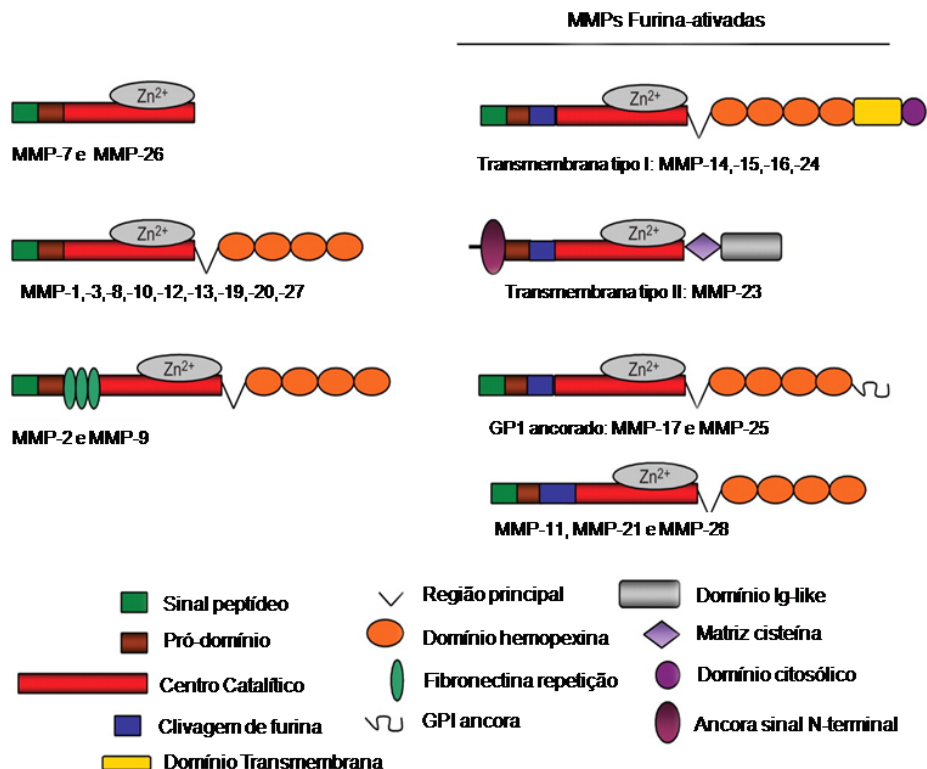
Os microRNAs foram descritos no início da década de 90 em *Caenorhabditis elegans*, em que se sugeriu um modelo molecular em que a tradução do RNAm lin-14 em proteína era inibida pela ligação de uma pequena molécula de RNA na extremidade 3' UTR do RNAm de lin-14 (Lee *et al.*, 1993). Sabendo da importância do papel dos microRNAs na regulação da proliferação, diferenciação celular e do controle da expressão gênica, pode-se concluir que uma alteração nesses padrões poderia levar a um grande número de patologias, tais como o câncer, doenças autoimunes, entre muitas outras. No caso do câncer, os microRNAs tem sido repetidamente associados aos diversos tipos de tumores, podendo esses atuarem como supressores de tumores ou como oncogenes (Sun e Tsao, 2008; Koturbash *et al.*, 2015).

1.3. Metaloproteases de Matriz Extracelular (MMPs)

As metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) são uma família de proteases dependentes de zinco capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular (MEC) (Stamencovik, 2000). São funcionalmente importantes em papéis fisiológicos como na organogênese, remodelação de tecidos, migração e adesão celular, angiogênese, desenvolvimento ósseo e em papéis patológicos como nos processos de invasão e metástase de neoplasias malignas (Page-Mccaw, 2008; Zhou *et al.*, 2010). Alguns membros desta classe de proteases possuem alguma seletividade quanto ao substrato, mas em geral, os espectros de ação das MMPs se sobrepõem (Deryugina e Quigley, 2006; Nagase *et al.*, 2006). As MMPs podem ser solúveis ou possuir domínios transmembrana (*membrane-type*–MT-MMPs). Mesmo as MMPs solúveis podem estar localizadas transitória ou permanentemente junto à membrana citoplasmática, através de interações com outras proteínas de membrana (Nagase *et al.*, 2006). A família de MMPs é constituída por 23 membros, incluindo 17 enzimas solúveis secretadas e 6 metaloproteases ancoradas à membrana (Radisky e Radisky, 2010; Cathcart *et al.*, 2015). Dependendo do substrato em que atuam e da estrutura do seu domínio, as MMPs são divididas em seis subgrupos que são: collagenase

(MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), estromelisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), e MMPs ligadas à membrana MT-MMP (MMP-14 ou MT1-MMP, MMP-15 ou MT2-MMP, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outras (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) (Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff, 2005; Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Em geral, MMPs são produzidas e secretadas como zimogênios. Estes contêm um peptídeo-sinal que direciona a proteína recém-traduzida para a secreção, e um pró-peptídeo, seguido pelo domínio catalítico, onde se liga o zinco (Bodey *et al.*, 1999; Chakraborti *et al.*, 2003). De acordo com o tipo de metaloprotease, a estrutura da enzima pode ser modificada pela perda ou incorporação de alguns domínios adicionais responsáveis pelas funções distintas das MMPs (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). As MMPs e seus domínios estruturais estão representadas na Figura 6. De maneira geral, a atividade da metaloprotease é controlada pelo equilíbrio entre a síntese da enzima e sua degradação por inibidores e/ou reguladores endógenos (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010).

FIGURA 6. DOMÍNIO DE GRUPOS DE METALOPROTEINASE DE MATRIZ (MMPs)



Fonte: Adaptação – (Loffek *et al.*, 2011).

Todas as MMPs humanas partilham pelo menos o peptídeo de sinal, o pró-domínio e o domínio catalítico. O pró-domínio contém cisteína que complexa o zinco. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 contêm três repetições de fibronectina dentro do seu domínio catalítico. Algumas MMPs têm um local de reconhecimento antes do domínio furina catalítico, o que permite a ativação intracelular do zimogênio por furina. Exceto para a MMP-7 e -26, todas as MMPs têm uma região flexível rica em prolina e um domínio C-terminal hemopexina semelhante, que funcionam em reconhecimento do substrato. A membrana ligada a MMP-14, -15, -16, -24 e contêm, além disso um domínio transmembrana e um domínio citosólico, enquanto que a MMP-17 e -25 estão integradas na membrana do plasma por um glicosilfosfatidilinositol (GPI). Ig: imunoglobulina.

A extensão da degradação da MEC está diretamente relacionada com o balanço entre MMPs e seus inibidores. Essa atividade das MMPs pode ser regulada por diferentes classes de proteínas, entre os mais descritos estão os inibidores teciduais das metaloproteases (TIMPs), as α -macroglobulinas (Duffy *et al.*, 2000; Sternlicht e Werb, 2001; Nagase *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007) e pela glicoproteína de membrana RECK (*Reversion inducing Cystein rich protein motif Kazal*) (Duffy *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2007). Esses inibidores, com exceção da proteína RECK, são secretados (Welm *et al.*, 2002).

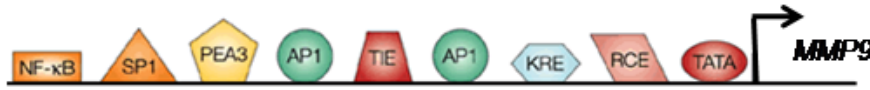
Existem quatro moléculas TIMPs identificadas que inibem as MMPs de forma seletiva (Chang e Werb, 2001). A TIMP-1 inibe a collagenase, estromelisina-1 e as formas ativas e inativas de MMP-9. A TIMP-2 inibe a forma pró-MMP-2, ao mesmo tempo que a ativa quando MMP-14 está presente. A TIMP-3 está associada com a MEC e inibe a secreção das pró-MMP-2 e 9 e a TIMP-4 é responsável por inibir a pró-MMP-2 (Baker *et al.*, 2000; Bernardo e Fridman, 2003). A glicoproteína de membrana RECK, possui uma característica única dentre os inibidores de MMPs, que é se ligar covalentemente à membrana citoplasmática e ser capaz de inibir MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (Takahashi *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2001) e MMP-7 (Omura *et al.*, 2009).

1.4. Proteína Metaloprotease-9 (MMP-9)

A metaloprotease de matriz 9 (MMP-9), também conhecida como 92 kDa collagenase do tipo IV, gelatinase de 92 kDa ou ainda gelatinase B, é uma gelatinase pertencente a família zinco-metaloproteases envolvidas na degradação de matriz extracelular (Stamencovik, 2000).

A proteína MMP-9 foi isolada em 1974 e originalmente denominada gelatinase de leucócito humana (Sopata e Dancewicz, 1974). Na maior parte dos tecidos, o nível de expressão de MMP-9 é muito baixo, mas aumenta em

resposta a secreção local de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, principalmente a interleucina 1 (IL-1) e o fator alfa de necrose e tumoral (TNF), dois indutores muito potentes do gene *MMP9* em muitos tipos celulares (Yan e Boyd, 2007). Em humanos o gene *MMP9* está localizado no cromossomo 20 q11.2-q13.1 e possui 7654 pares de bases, organizados em 13 exons (Huhtala *et al.*, 1991). Seu transcrito de mRNA possui 2,4 kb e variantes de processamento alternativo não foram relatados (Masure *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 2011; Farina e Mackay, 2014). Sato e Seiki mostraram na estrutura do promotor do gene *MMP9*, locais para proteína ativação 1 (AP-1), fator nuclear kappa B (NFkB), e proteína de ligação de especificidade 1 (SP-1), locais esses que desempenham um papel fundamental na indução da ativação do gene (Sato e Seiki, 1993). Ainda na região promotora encontramos um sítio TATA-like (-29 a -25 pb), dois sítios para AP-1 em consenso (-79 para -73 pb e -531 para -527 pb), um elemento de resposta de NFkB (-600 a -590 pb), um sítio GC (-562 a -557 pb), um sítio para o fator transcrição de crescimento beta (TGFβ) (-474 a -467 pb) (Shimajiri *et al.*, 1999). Enquanto Sp1 e PEA-3 atuam como co-ativadores, tem sido bem estabelecido que os sítios de ligação de AP-1 e NFkB são essenciais para a expressão de *MMP9* (Esteve *et al.*, 2002; De Launoit *et al.*, 2006). Dois locais de ligação distantes AP-1 são encontrados no promotor proximal, contudo o sítio AP-1 localizado entre as posições -79 a -73 pb parece ser o mais importante, uma vez que a sua deleção elimina quase completamente a expressão de *MMP9* (Gum *et al.*, 1997). Estes sítios podem ser vistos na Figura 7.

FIGURA 7. ESQUEMA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP9*

Fonte: Adaptação (Overall e Lopez-Otin, 2002)

O promotor é mostrado na direção 5'-3', com o local de início da transcrição indicado com uma seta preta, e os fatores de transcrição de ligação e os sítios colocados dentro de caixas coloridas. As posições relativas dos diferentes elementos não estão em escala. Sítios de transcrição de ligação de fatores incluem: o fator nuclear kapa B (NFkB), o fator de transcrição da proteína 1 (SP1) o potencializador-A ligação da proteína de 3-local poliomavírus (PEA3), proteínas ativadoras 1 (AP-1), elemento de diferenciação de queratinócitos-fator responsivo (TIE), local, o elemento de controle do retinoblastoma (Koboldt *et al.*) o fator de crescimento de transformação elemento inibidor local (Global Burden of Disease Cancer *et al.*) e por ultimo a caixa TATA.

Podemos definir resumidamente a proteína MMP-9 como uma metaloenzima com multi-domínios, contendo um sítio catalítico constituído por um domínio de ligação de metal, separadas do sítio ativo por três repetições de fibronectina que facilitam a degradação dos substratos de grande porte, tais como a elastina e colágeno desnaturado ou gelatina. Quanto a sua atividade enzimática, a MMP-9 é inibida pela $\alpha 2$ -macroglobulina (Rehman *et al.*, 2013), pelos membros da família de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs) como a TIMP-1 inibe a collagenase, estromelisina-1 e as formas ativas e inativas de MMP-9 e a TIMP-3 está associada com a MEC e inibe a secreção das pró-MMP-2 e MMP-9 (Gomez *et al.*, 1997) e RECK (Omura *et al.*, 2009).

Ao contrário de quase todas as MMPs, a descoberta das funções fisiológicas e patológicas da MMP-9 tem aumentado em um ritmo constante. O envolvimento da MMP-9 na progressão do tumores malignos já passou de um conceito original com o papel quase exclusivo na degradação da matriz, associada à invasão tumoral, para incluir os papéis em quase todos os aspectos da biologia do tumor que vão desde a iniciação e a progressão precoce, à angiogênese, disseminação, invasão e motilidade, formação do nicho de células-tronco do câncer, regulamentação da vigilância imunológica do tumor, preparação do local metastático e promoção do crescimento metastático (Farina e Mackay, 2014). Níveis elevados da expressão de MMP-9 tem sido associadas significativamente com as taxas de sobrevivência mais curta em pacientes com câncer de mama (Talvensaari-Mattila *et al.*, 2003; Quaranta *et al.*, 2007; Dufour *et al.*, 2011). Além dos estudos em tumores,

ocorre também aumento dos níveis de MMP-9 no soro de pacientes com carcinoma ductal invasivo. Estes parâmetros foram relacionados com a severidade da doença (Provatopoulou *et al.*, 2009). O gene *MMP9* está relacionado com várias outras neoplasias tais como o câncer de bexiga, de próstata, cervical, pele e de epitélio bucal, câncer de laringe e de nasofaringe, tumores cerebrais, câncer do sistema digestivo, linfomas, leucemias, mielomas múltiplos, câncer de pulmão, câncer de ovário e fibrossarcomas (Vandooren *et al.*, 2013).

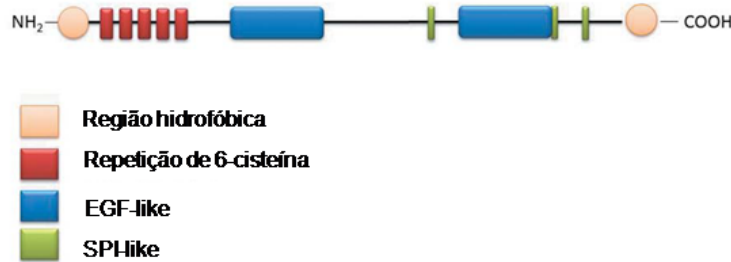
1.5. Proteína RECK

A proteína RECK (*Reversion inducing Cystein rich protein – motif Kazal*) possui implicações importantes na biologia do câncer (Takahashi *et al.*, 1998), sendo normalmente expressa em todas as células humanas com um papel importante no equilíbrio das características construtivas e destrutivas da matriz extracelular. A proteína RECK é uma glicoproteína ancorada à membrana e atua na remodelação tecidual controlando a atividade de enzimas tais como as metaloproteases, especialmente MMP-9 inibindo a secreção da sua pró-forma (Takahashi *et al.*, 1998). Sua expressão é suprimida em muitos tumores e em células transformadas (Noda *et al.*, 2003). Além disso, a restauração da expressão do gene *RECK* (Takahashi *et al.*, 1998) inibe as atividades invasivas e metastáticas de células tumorais através da inibição das MMPs (MMP-9, MMP-2 e MT-MMP-1) (Oh *et al.*, 2001; Ohl *et al.*, 2005). A relação negativa entre o nível de expressão de RECK e a agressividade de tumores foi demonstrada em diversos tipos de neoplasias, como da mama (Span *et al.*, 2003; Figueira *et al.*, 2009), próstata (Ohl *et al.*, 2005), pulmão (Pesta *et al.*, 2009), gliomas (Correa *et al.*, 2006), estômago (Song *et al.*, 2006) e osteossarcomas (Kang *et al.*, 2007). O aumento da expressão deste gene em tumores confere um melhor prognóstico ao paciente (Noda e Takahashi, 2007).

O gene *RECK* está localizado no cromossomo 9p12-13 (Takahashi *et al.*, 1998) e se estende por uma região de 87 kb e contém 21 exons e 20 íntrons. A proteína RECK consiste em 971 aminoácidos, é rica em cisteína

(9%) e inclui regiões hidrofóbicas em ambas as extremidades, a NH₂-terminal e do terminal COOH e sua estrutura simplificada pode ser vista na Figura 8.

FIGURA 8. A ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA PROTEÍNA RECK



Fonte: (Alexius-Lindgren *et al.*, 2014)

EGF: fator de crescimento epidérmico; SPI: inibidor de protease de serina; contem as repetições de 6-cisteínas; e a região denominada hidrofóbica.

O gene *RECK* possui duas variáveis de transcrito, *RECKB* e *RECKI* sendo ambas formas canônicas ou variáveis, parecem estar associada com bom prognóstico em câncer (Trombetta-Lima *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A relação entre as metaloproteases, as proteínas da MEC e câncer vem sendo estudadas intensamente buscando o entendimento dos mecanismos moleculares das metástases.

O gene *MMP9* pode ser controlado por diversas moléculas como revisado anteriormente (Overall e Lopez-Otin, 2002; Yan e Boyd, 2007). A metilação de alguns CpGs presentes no promotor é um importante mecanismo de regulação da expressão do gene *MMP9*, como foi observado em linhagens de linfoma murino (Chicoine *et al.*, 2002) e em linhagens tumorais de pâncreas (Sato *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que a desmetilação de sítios CpG localizados em determinadas posições dentro da região promotora promove a ativação do gene *MMP9* na artrite reumatóide (Roach *et al.*, 2005). Farias e colaboradores (2012) ao avaliarem os mesmos sítios CpG que Roach *et al.*, (2005), obtiveram os mesmos resultados de ativação do gene *MMP9* em linhagens de ameloblastoma quando havia desmetilação do DNA induzida por 5-aza-2'-desoxicitidina nesses sítios CpG específicos (Farias *et al.*, 2012). Outro estudo com este composto mostrou que o tratamento de linhagens leucêmicas também induziu a expressão de *MMP9* (Bernal *et al.*, 2013). Contudo, apesar desses estudos, o envolvimento da metilação do DNA ainda é um ponto obscuro na regulação da expressão do gene *MMP9* (Labrie e St-Pierre, 2013). Além disso, há evidências de que o gene *MMP9* também tem regulação epigenética através da modificação de histonas, uma vez que a desacetilação de histonas, promovida por inibidores da HDACs (histona desacetilases), atuam na modulação da atividade do gene *MMP9* em diversos tipos celulares (Labrie e St-Pierre, 2013).

Em uma análise preliminar do gene *MMP9* foram encontrados ilhas de CpG que não se encontram dentro ou próximos a região do início de transcrição. Como recentemente vem sendo discutida a importância da metilação de ilhas CpGs encontrados no corpo do gene (Kulis *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014), além das regiões contendo CpGs na região promotora do gene, buscou-se esclarecer a hipótese de que essas ilhas de CpG (CGIs – CpG em região intragênica) e seus perfis de metilação poderiam ter correlação com a expressão do gene *MMP9* em linhagens tumorais de mama. Além disso, estudos da relação entre as marcas de histonas que abrem ou fecham a

cromatina ainda não foram elucidadas na regulação do gene *MMP9*. Foi incluído no estudo o efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina, ou decitabine, porque o mesmo vem sendo utilizado em terapia anti-câncer em diversos estudos clínicos avançados (Nie *et al.*, 2014). Como demonstrado em linhagens de leucemia mielóide aguda e mielodisplasia onde houve aumento da expressão de MMP-9, desmetilação de um CpG no promotor na posição -36 e consequente pior prognóstico da doença (Bernal *et al.*, 2013). Por isso procurou-se aqui também avaliar o efeito do decitabine sobre o perfil de metilação do gene *MMP9*. Diante disso os objetivos desse trabalho foram os descritos a seguir.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação do gene *MMP9* na região promotora e nas ilhas de CpGs localizadas no corpo do gene (CGIs) e correlacionar os resultados com a expressão do gene *MMP9* em linhagens celulares e amostras de tumores de mama.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do gene *MMP9* em linhagens tumorais de mama, com e sem tratamento com agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina e tricostatin A por PCR em tempo real.
- Estudar o perfil de metilação da região promotora e das ilhas CpGs localizadas no corpo do gene *MMP9* em linhagens tumorais de mama, com e sem tratamento com agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina e inibidor de histona desacetilase tricostatin A.
- Verificar se perfil de metilação observado em linhagens pode ser observado em tumores de mama.
- Correlacionar o perfil de metilação do gene *MMP9* da linhagem tumorais de mama MCF7, com as modificações de histonas H3K4me3 e H3K27me3, na região promotora e em ilhas de CpGs presentes no corpo do gene.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são provenientes da ATCC e foram MCF7, PMC42, MDA-MB-436 (linhagens de tumores de mama) e HeLa (linhagem de câncer cervical).

O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com glutamina 2 mM e contendo gamicina 40 µg/ml, soro fetal bovino 10% (Gibco) em ambiente de CO₂ 5% à 37°C, seguindo o protocolo sugerido pela ATCC.

4.2. Avaliação do padrão de expressão do gene *MMP9* e *RECK* em linhagens tumorais de mama

A expressão dos genes *MMP9* e *RECK* foram avaliadas por PCR em tempo real (qPCR) utilizando o equipamento Applied Step One Plus. O RNA total e o DNA foram isolados de um número aproximado de 2 - 4 x 10⁶ células utilizando o kit All Prep DNA/RNA (Qiagen). Aproximadamente 1000 ng de RNA total foi transcrito reversamente com a enzima transcriptase High Capacity polimerase (Applied, Biosystems) conforme instruções do fabricante.

Os iniciadores específicos para o gene *MMP9* foram os mesmos descritos na literatura (Figueira *et al.*, 2009) Tabela 1. Iniciadores específicos para gene *RECK* descrito em literatura (Trombeta-Lima *et al.*, 2015) (Tabela 1). Para reação de qPCR cada 10 µl de reação continham 900 nM de cada iniciador, 3 µl de SYBR® Green I (Applied Biosystems) e cDNA diluído 1:2. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes. As condições de amplificação utilizadas pelo aparelho foram: 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação, anelamento dos iniciadores a 60°C durante 20 segundos e extensão a 60°C durante 1 min. Os genes de referência utilizados foram o *GAPDH*, *ACTB* e *HPRT*. As sequências dos iniciadores utilizados nas amplificações dos genes constitutivos foram os mesmos descritos por Figueira e colaboradores (Figueira *et al.*, 2009). Para os cálculos, os valores de Ct obtidos da amplificação do transcrito de *MMP9* sob os diferentes tratamentos e linhagens, foi descontado da média dos valores de Ct dos normalizadores e aplicados na fórmula de $\log_2^{2^{\Delta\Delta CT}}$ (Livak e

Schmittgen, 2001). Os valores de Ct obtidos foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e considerados significativos se $p < 0.05$.

4.3. Análise de metilação da região promotora de *MMP9* por digestão do DNA sensível a metilação

Roach e colaboradores (2005) fizeram o planejamento de iniciadores para estudo de CpGs presentes na região promotora do gene *MMP9*. Foram também utilizadas enzimas de restrição sensíveis a metilação *Acil* e *HhaI*, sendo que os sítios são CCGC e GCGC respectivamente. O método utiliza a sensibilidade à metilação do DNA por essas enzimas de restrição sendo que caso as citosinas estejam metiladas, a posterior amplificação por PCR produz uma banda equivalente ao das amostras de controle não digeridas. Por outro lado, se a clivagem da enzima de restrição, ocorre porque os CpGs não estão metilados nenhum fragmento é detectado após o PCR. A Tabela 2 mostra os iniciadores utilizados nas reações de PCR após a digestão enzimática de DNA de linhagens ou de tumores de mama. As condições de amplificação foram as descritas por (Roach *et al.*, 2005).

4.4. Clonagem e sequenciamento da CGI1, CGI2 e da região promotora do gene *MMP9*

A análise do perfil de metilação das ilhas de CpG do gene *MMP9* foi iniciada através da escolha das regiões a serem clonadas após análise *in silico* utilizando o programa Blat disponível em UCSC Genome browser (<https://genome.ucsc.edu>). Esta ferramenta mostra a região genômica que contém ilhas de CpG em torno do início de transcrição de acordo com os seguintes critérios: conteúdo CG maior ou igual a 50%, tamanho do fragmento maior do que 200 pb e razão de 0,6 para o número de CG observados sobre esperados (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). As regiões de DNA mostradas pelo programa foram alinhadas em outro programa denominado Methprimer. Neste software foram selecionadas as regiões de DNA para clonagem de ilhas de CpG (agrupadas em 2 módulos denominados CGI1 e CGI2) utilizando para isso os iniciadores listados na Tabela 3. Para a clonagem da região promotora que contém os CpG nas posições -233, -223, -185 e -36 (Roach *et al.*, 2005)

foram planejados iniciadores específicos deste estudo e estão na Tabela 3 assim como os iniciadores utilizados para clonagem dos CpGs 12-30 da CGI2. Para clonagem foi feito isolamento do DNA das linhagens utilizando o protocolo All prep DNA/RNA (Qiagen) no mesmo momento em que foi feita a extração de RNA total. Após o isolamento, o DNA quantificado foi tratado com bissulfito de sódio (Jeronimo *et al.*, 2001) utilizando o protocolo EpiTect (Qiagen).

Após o tratamento do DNA foi feita a amplificação das regiões de interesse do gene *MMP9* a partir das diferentes linhagens do estudo. Os produtos amplificados foram purificados de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo utilizando o protocolo QIAGEN Quick Gel Extraction. Após cada etapa de purificação o fragmento foi quantificado no aparelho Nanodrop modelo 2000 e visualizado em gel de agarose.

As reações de ligação foram feitas utilizando aproximadamente 200 ng de fragmento e 50 ng do vetor PGEMT easy (Promega) conforme especificações do fabricante. As ligações foram então eletroporadas em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones foram selecionados por alfa-complementação em meio seletivo contendo Xgal (50 µg/ml) e IPTG (45 µg/ml) e ampicilina 250 µg/mL (marca de resistência do vetor) e estreptomicina 40 mg/mL (marca de resistência da estirpe DH10B). Para cada região de interesse foram selecionados pelo menos oito colônias brancas de cada linhagem (para permitir uma abordagem suficiente de alelos). Cada clone foi selecionado a partir de uma reação de PCR de colônia para confirmar a clonagem. A seguir o DNA plasmidial de cada clone foi purificado utilizando o protocolo *QiaPrep spin miniprep* (Qiagen). O DNA plasmidial de cada clone foi submetido a reação de sequenciamento utilizando o protocolo BigDye terminator (Applied Biosystems) segundo fornecedor. Em um sistema de 10 µL contendo: 3 µL de Big Dye Terminator v3.0, 1 µL de Tampão *Save Money* 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl₂), 10 pmoles de um dos iniciadores universal ou reverso (Invitrogen) e aproximadamente 200 ng de DNA plasmidial. As condições das reações foram: desnaturação por 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos e 30 segundos para anelamento e extensão. O produto amplificado foi purificado utilizando 60 µl de isopropanol 75% seguido de incubação a -20°C por 15 minutos. O material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min e lavado com etanol 60%, centrifugado novamente, retirado o etanol e seco a 37°C. Ao material seco foi acrescentado 10 µl de

formamida e a seguir submetido a desnaturação 95°C por 5 min. O sequenciamento de cada clone foi realizado no sequenciador capilar Applied Biosystems Seq 3500 XL Genetic Analyzer.

4.5. Tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina e Tricostatin A

Algumas linhagens foram tratadas com agente desmetilante *in vivo* 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadC) 1µM e com inibidor de desacetilação de histonas tricostatin 40 µM (Sun e Tsao, 2008) a fim de analisar e confirmar o envolvimento de eventos epigenéticos no silenciamento do gene *MMP9*. Para cada ensaio foi utilizado em torno de 5×10^5 de células. O ensaio foi feito simultaneamente em 4 cultivos separados, controle sem tratamento, 5-azadC, TSA, e 5-azadC mais TSA. Todos os cultivos com 5-azadC tiveram o meio trocado diariamente bem como do reagente por 7 dias. O tratamento com TSA foi feito incubando as células com o composto por 16 horas. No tratamento com 5-azadC e TSA foi adicionado 5-azdC por 7 dias seguido e TSA 40 µM nas últimas 16h.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida 8% foram preparados a partir de uma solução de poliacrilamida e bisacrilamida na proporção 29:1, TEMED (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) 10% como catalisador da reação. A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio a 80-100 V por aproximadamente uma hora em tampão TBE 1 X (ácido bórico 100 mM e EDTA 10 mM). O gel foi incubado por três minutos em solução fixadora (0,5% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação suave. A esta solução adicionou-se nitrato de prata 10% (o gel permanece sob agitação por mais dez minutos). Após impregnação do DNA com prata, o gel foi lavado com água ultrapura e a este foi adicionado o revelador (hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%) por mais cinco minutos, sob agitação. Após a revelação, o gel foi lavado com água ultrapura, e deixado por mas três minutos em solução fixadora, após o gel foi seco em papel celofane e sua imagem foi digitalizada.

4.7. Análise de atividade da proteína MMP-9 por zimografia

A atividade da proteína MMP-9 obtida a partir do cultivo das linhagens celulares foi avaliada por zimografia. Os sobrenadantes dos cultivos celulares foram coletados e as metaloproteases foram concentradas utilizando polímeros de agarose acoplados à gelatina. Os sobrenadantes das culturas foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE copolimerizada com 0,1% de gelatina. A revelação foi feita por coloração com *Coomassie blue* seguido de descoramento. A enzima MMP-9 pôde ser evidenciada pela degradação da gelatina e, portanto, ausência de coloração azul no local onde as enzimas se encontram. Todos esses procedimentos foram conduzidos conforme a descrição em (Toth e Fridman, 2001; Das *et al.*, 2008). Os resultados foram mostrados utilizando-se o software Imaje J no qual foi medida a área das bandas da MMP-9 ativa. Esses dados foram então plotados em um gráfico e avaliados estatisticamente utilizando o teste *t* Student.

4.8. Imunohistoquímica das Amostras de Tumores de mama

As amostras de tumores mamários utilizadas neste estudo são provenientes de amostras em blocos em parafina de tumores de pacientes do Hospital de Clínicas Curitiba-PR. Foram selecionadas 5 amostras que foram dispostas utilizando-se a técnica de TMA seguindo protocolo desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental –PUCPR (Schuler *et al.*, 2008).

As reações de imunohistoquímica foram realizadas nas secções dos tumores provenientes do bloco de TMA. As lâminas contendo os tumores foram desparafinizadas através de 2 lavagens em xilol por 10 minutos, 3 lavagens com etanol absoluto por 1 minuto e 1 vez com álcool etílico 80% por 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o protocolo Advance (Dako®), que apresenta solução de peróxido de hidrogênio 5% em metanol. Após retirar o excesso dos reagentes, foi realizada a recuperação antigênica no Imuno Retrifer (Dako®) em banho Maria à 99°C por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso dos reagentes. O anticorpo primário contra MMP-9 empregado foi o

monoclonal de camundongo NCL-MMP9-439, clone 15W2 da Novacastra Laboratório Ltda. As lâminas foram incubadas em câmara úmida na geladeira por toda a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e depois incubadas por 15 minutos com tampão TBS tris pH 7,3. A seguir, o anticorpo secundário: foi adicionado por 30 minutos, seguido do reagente Advance enzyme (Dako®) por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi o DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Foram realizadas as lavagens em água por 5 minutos, 3 vezes com etanol absoluto por 1 minuto e a diafanização com 3 lavagens com xilol por 5 minutos. Por último, foi adicionada a lamínula para proteção dos cortes. Os cortes foram analisados pela patologista Dra. Lúcia de Noronha do Laboratório de Patologia Experimental – PUCPR

4.9. Imunoprecipitação de Cromatina da linhagem MCF7

Esta técnica foi utilizada com a linhagem MCF7 e MCF7 tratada com 5-aza-2'-desoxicitidina. Foram utilizadas culturas em placa de 60 mm de diâmetro contendo aproximadamente 6×10^6 células. O meio das culturas foi aspirado e adicionado 10 mL de PBS 1x estéril com formaldeído 1%. Após a incubação da placa por 10 min a 37°C foi adicionado 400 µL de glicina 2,5 M (concentração final de 0,1 M) e incubado por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 x com 9 mL de PBS 1x a 4°C. As etapas seguintes foram realizadas utilizando o protocolo EpiTect® ChIP One Day (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1,5 mL de tampão de raspagem (PBS 1x contendo coquetel de inibidor de protease 1x) foram adicionados à placa e as células foram raspadas da superfície plástica com o auxílio de uma haste de borracha (*scrape*). O volume de células foi transferido para um tubo de 2 mL e centrifugado 800 x g, 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e adicionado 400 µL de tampão de lise contendo inibidor de protease. O volume de células foi submetido à lise por sonicação no aparelho Covaris® com 13 ciclos de 60 seg (sob as condições *Duty* – 5%, *Intensity* – 2, *Cycles/Burst* – 200) e centrifugados a 14.000 x g por 10 min a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de *pré-clear* que consiste da incubação com *beads* de proteína A. O sobrenadante foi dividido em alíquotas e imunoprecipitadas com anticorpos anti-histonas, H3K27me3,

H3K4me3 e o controle H3 (Qiagen) a uma concentração de 2 µg/mL por aproximadamente 16 h em homogeneizador rotatório a 4°C. Em seguida, os fragmentos ligados aos anticorpos foram tratados com *beads* de proteína A e lavados com sucessivos tampões. O DNA foi isolado, transferido para uma coluna e em seguida eluídos em água. As amostras foram quantificadas no equipamento Nanodrop 2000.

4.10. Quantificação por qPCR após a imunoprecipitação de cromatina

Para o ensaio de qPCR após a ChIP os controles testados foram os genes *MYOD1* (controle positivo para H3K27me3), *GAPDH* (controle positivo para H3K27me3 e H3K4me3) em concentrações de 400 nM (conforme especificações da Qiagen). Para a comparação entre todas as amostras foi escolhido o gene *GAPDH* como controle. Em sistemas de 10 µL, 25 ng de DNA imunoprecipitado foi utilizado contendo 6 µL de SYBR®Green 1x (Applied Biosystems). As regiões amplificadas foram os locais de ligação de NFκB e AP-1 no promotor (Cock-Rada *et al.*, 2012) e CGI2 intervalo de CpGs 12-30, os iniciadores utilizados estão na Tabela 1.

4.11. Declaração de Ética

Todos os pacientes deram o seu consentimento informado por escrito para o uso de seus tecidos para ser retido e analisados para fins de investigação. Todos assinaram formulários de consentimento, que estão sob a custódia do autor correspondente a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa aprovou este estudo como número do processo CAAE: 17126913.1.0000.0096. Institucional foi aprovado pela Comissão de Seres Humanos Ética Pesquisa da Universidade Federal do Paraná com o registro número 9988-354 / 2013.

4.12. Análise Estatística

A análise foi realizada em triplicata, em todos os experimentos e os valores foram analisados pelo teste *t* Student e ANOVA sendo que $p < 0,05$ foi considerado significativo.

TABELA 1. INICIADORES (qPCR) PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *MMP9* E *RECK* E IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA

NOME	INICIADORES
<i>MMP9</i> -F	5' CCTGGAGACCTGAGAACCAATC 3'
<i>MMP9</i> -R	5' GATTTCTGACTCTCCACGCATCT 3'
<i>RECK</i> -F	5' TGGAAAGCAATAGCTTGTTCACT 3'
<i>RECK</i> -R	5' CTTTCAGCTGTGTGGTCTTCAG 3'
CHIP9PMAP1F	5' AGAGAGGAGGAGGTGGTGTAA GC 3'
CHIP9PMAP1R	5' ACCCCACCCCTCCTTGAC 3'
CHIP9PMNFKbF	5' GGGTTGCCCCAGTGGAAT 3'
CHIP9PMNFKbR	5' AGCTTCCTCTCCCGCTTCAT3'
CHIPP9I2PCRF2	5' ACGCAGTTTAGCAAACGT 3'
CHIPP9I2PCRR2	5' TAGAACGCGAGGAGGGAGA 3'

TABELA 2. INICIADORES E AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS PARA A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP-9*

NOMES	INICIADORES	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO	SEGMENTO DE CORTE DAS ENZIMAS
M9B F	5'GGGCCAGGGGGATCATTAGTTTCAG3'	-421 Para -396	486 pb	<i>Acl</i> I a -185, - 223 e -233
M9B R	5'CAGCCCAGCACCAGGAGCACCAGGAC3'	+40 Para -65		<i>Hha</i> I em -36

TABELA 3. INICIADORES PARA CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS CGI1, CGI2 E DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP9*

NOME	INICIADORES	TAMANHO	Nº de CpGs
ILHA CpG 1	(601 - 2581)		
1-F1I1AP9	5'TATGGGGTGTTTTTGTTGTT 3'	380 pb	30
2-R1I1AP9	5'CTAACCCTATACACTATCTAAC 3'		
3-F3I1BP9	5'GTTAGATAGTGATAGGGTTAG 3'	500 pb	37
4-R2I1BP9	5'TAATACTACACCAAAACAAA 3'		
5-F4I1CP9	5'TTTGTTTTGGTGTAGTATTA 3'	520 pb	28
6-R3I1CP9	5'TTAAAAACCAATACATAAT 3'		
7-F5I1DP9	5'TTATTATGTATTGGTTTTT 3'	447 pb	31
8- R4I1DP9	5'TAACCACCCACCACCACCACT 3'		
ILHA CpG 2	(3781 - 4741)		
1-F1I2AP9	5'GGTTTTGTGTTTAAGGTTTAGAG 3'	366 pb	28
2-R1I2AP9	5' TCCCTACAACCCAAAAACAA 3'		
5-F3I2BP9	5' TTGTTTTTGGGTTGTAGGGA 3'	540 pb	53
3-R2I2BP9	5'TATTTCCATTTCCAAAACTTTTTTC 3'		
PROMOTOR			
<i>MMP9</i> PF	5' GATTAAGGGATGGGGGATTT 3'	330 pb	4
<i>MMP9</i> PR	5' CAAAAAACTCATAATAAAAAACAAAA 3'		

TABELA 4. CARACTERIZAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA

Tumor	Identificação	Idade	Linfonodos	RE	RP	Metástase	IHQ MMP9
T1	CP497	45	+	+	+	-	-
T2	CP243	48	+	+	+	-	-
T3	CP422	75	-	+	+	+	+
T4	CP515	63	-	+	+	+	+
T5	CP620	44	-	+	+	+	+

5. RESULTADOS

5.1. Expressão dos genes *MMP9* e *RECK*

A expressão do gene *MMP9* na linhagem de tumor cervical HeLa é extremamente baixa, por essa razão ela foi utilizada como padrão para os níveis basais dessa enzima (Roomi *et al.*, 2009). Por outro lado, a linhagem tumoral de mama PMC42 apresenta altos níveis de expressão da *MMP-9* quando analisada por zimografia (resultados anteriores do nosso laboratório). Assim quando avaliadas as linhagens de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-436 pode-se concluir que ambas expressam pouco o gene *MMP9* em comparação com todas as linhagens (Figura 9 A). A linhagem PMC42 apresentou em torno de 20 vezes mais expressão de *MMP9*, sendo estatisticamente distinta das demais linhagens. A expressão gênica pôde ser confirmada pela análise do zimograma onde foi observada uma banda muito intensa produzida pela linhagem PMC42 e ausência de sinal pela linhagem HeLa. As linhagens MCF7 e MDA-MB-436 apresentaram sinal de menor intensidade com diferença significativa, como pode ser visto pela área de digestão (Figura 9 B).

A proteína RECK é um inibidor de *MMP-9* e por isso foi também avaliada a sua expressão gênica nas linhagens deste estudo. Pode-se observar na Figura 10 que o gene *RECK* é significativamente mais expresso com relação ao gene *MMP9* em todas as linhagens, exceto na linhagem PMC42 em que sua expressão é extremamente baixa na mesma comparação.

5.2. Efeito de agente desmetilante e inibidor de HDAC sobre a expressão do gene *MMP9*

Afim de se avaliar se a diminuição da expressão do gene *MMP9* observada nas linhagens MCF7 e MDA-MB-436 estaria ocorrendo por eventos epigenéticos foram feitos tratamentos dessas linhagens com o agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadC) e com o inibidor de desacetilação de histonas tricostatin A (Sun e Tsao,2008). Pode-se observar que o tratamento com 5-azadC aumentou significativamente a expressão de

MMP9 em ambas linhagens, assim como TSA, relativamente ao controle não tratado. No entanto não houve um efeito aditivo quando ambos agentes foram utilizados nos tratamentos (Figura 11 A e B). A utilização da incorporação ao DNA de 5-azadC é um protocolo padrão nos estudos preliminares de efeito da metilação do DNA na expressão gênica. O efeito desse agente aumentando a expressão de *MMP9*, indica que pode estar ocorrendo hipermetilação de *MMP9* contribuindo para o seu silenciamento nessas linhagens, assim como envolvimento das histonas a partir dos resultados obtidos com TSA

Devido ao efeito observado de aumento da expressão de *MMP9* após esses tratamentos, em seguida foi investigado o efeito destes sobre o gene *RECK*. Pode-se observar que ambas as linhagens MCF7 e MDA-MB-436 expressam o gene *RECK* significativamente mais do que *MMP9* (Figura 12 A e B). Porém, depois do tratamento com 5-azadC esta relação se inverteu, assim como para os demais tratamentos com TSA e 5-azadC mais TSA (Figura 12 A, B). Este resultado mostra assim que existe uma expressão basal de *RECK* nas linhagens que não se altera mediante os tratamentos assim como observado com *MMP9*, em se tratando de 5-azadC. É provável que, pelo menos na linhagem MCF7 ocorra apenas o efeito de desacetilação de histonas. Com estes resultados foi possível inferir até este ponto que o tratamento com 5-azadC foi capaz de induzir a desmetilação do gene *MMP9* mas não de *RECK* e aparentemente, o gene *RECK* não é regulado por metilação do DNA. Ainda pode-se também concluir que uma vez que o gene *RECK* não sofre aumento de expressão depois do tratamento com 5-azadC a proteína MMP-9 não sofrerá inibição nessas condições. A partir destes dados o estudo continuou com enfoque especificamente sobre *MMP9* e o efeito de 5-azadC e TSA.

5.3. Expressão do gene *MMP9* em tumores de mama

Para comparação dos resultados obtidos com as linhagens tumorais de mama foram incluídas neste estudo 5 amostras tumorais de pacientes para análise molecular e por imunohistoquímica. Pode-se observar na Figura 13 A e B uma amostra negativa e uma positiva para a proteína MMP-9 respectivamente. A Tabela 4 contém dados de identificação clinicopatológicas das amostras desse estudo.

5.4. Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene *MMP9* por digestão seguida de PCR

A região promotora do gene *MMP9* não possui ilhas de CpG porém diversos estudos tem mostrado a importância de alguns CpGs específicos que podem regular a expressão desse gene. Assim sendo, foi incluída neste trabalho uma análise mais detalhada dessa região. Inicialmente foi utilizada a abordagem utilizando a digestão do DNA com enzima sensível a metilação seguida de PCR de regiões específicas como descrito por Roach *et al.*, (2005) em osteoartrite. Porém, apesar de várias tentativas de padronização dessa técnica não foram obtidos resultados satisfatórios. Por essa razão não foi dada continuidade dessa abordagem e prosseguiu-se com a clonagem dessa região.

5.5. Clonagem da região promotora do gene *MMP9*

A região promotora que foi analisada nesse estudo contém 4 CpGs que foram avaliados em outros estudos como sendo importantes para expressão do gene *MMP9* (Roach *et al.*, 2005). Estes CpGs podem ser vistos na Figura 14.

Após a clonagem e sequenciamento da região promotora que contém os 4 CpGs nas posições -233, -223, -185 e -36 foram observados que os mesmos encontram-se altamente metilados (aproximadamente 80%) na linhagem MCF7 e MDA-MB-436 (Figura 15). Por outro lado, após o tratamento com 5-azadC foi observada desmetilação (mais do que 50%) significativa destes CpG na região promotora em ambas linhagens (Figura 15).

A clonagem dessa mesma região de DNA a partir de 5 amostras de pacientes (Figura 16) mostrou que os tumores que não expressam MMP-9 (visto pela IHQ) possuem os 4 CpG da região promotora metilados (T1 e T2). Por outro lado, a mesma região analisada em amostras que expressam MMP-9 (T3, T4 e T5) estes CpGs apresentaram-se desmetilados. Estes resultados reforçam o efeito observado anteriormente com as linhagens, demonstrando que mesmo também pode ocorrer em tumores de mama.

5.6. Clonagens das ilhas de CpG do gene *MMP9*

A análise de busca de ilhas de CpGs através do programa Human Blat mostrou que existem 4 regiões ricas em CpG dentro do corpo do gene *MMP9*, nomeadas pelo software pelo número de CpGs e são CpG65, CpG63, CpG24 e CpG48 (ver Figura 14). Neste trabalho para fins de clonagem foram unidas as ilhas 65 e 63 e nomeadas como ilha de CpG intragênica 1 (CGI1) e as CpGs 24 e 48 nomeadas ilha de CpG intragênica 2 (CGI2). A CGI1 contém 128 CpGs e apresentou-se altamente metilada nas linhagens MCF7 e MDA-MB-436 antes e após o tratamento com 5-azadC (Figura 17 A e B). Por outro a CGI2 mostrou um perfil de metilação totalmente diferente. Tanto na linhagem MCF7 quanto MDA-MB-436 foram observados alguns CpGs altamente metilados no início da CGI2 (até o trigésimo CpG) e logo em seguida queda dos níveis de metilação (Figura 18 A e B). Após o tratamento com 5-azadC uma região entre os CpGs 12 e 30 apresentou total desmetilação sem alteração em outros lugares. A partir destes resultados foram planejados iniciadores específicos para a clonagem da região de DNA que continha os 30 primeiros CpGs da CGI2 utilizando os tumores de mama do estudo. Os resultados mostrados na Figura 19 mostram que os 2 tumores menos agressivos (T1 e T2) tem mais de 60% de metilação em média entre os CpGs 12 e 30. E os tumores com expressão de MMP-9 (T3, T4 e T5) essa mesma região apresentou-se desmetilada de modo similar aos resultados observados nas linhagens tratadas.

Os resultados dos tratamentos das linhagens MCF7 e MDA-MB-436 com TSA e TSA mais 5-azadC para a CGI2 podem ser vistos na Figura 20. Pode-se observar que o tratamento com TSA produziu também um efeito desmetilante nos CpGs 12 a 30 e quando ambos foram colocados no cultivo o efeito desmetilante foi mais intenso com desmetilação de quase 100% de todos os CpGs a partir do CpG 12.

5.7. Imunoprecipitação de cromatina

Sabe-se que a desmetilação do DNA pode ser acompanhada de modificações no perfil de modificação pós-traducional de histonas. Por essa razão e a partir dos resultados obtidos até este ponto, foi escolhida a linhagem MCF7 e o tratamento com 5-azadC para avaliar este efeito. Outros tratamentos

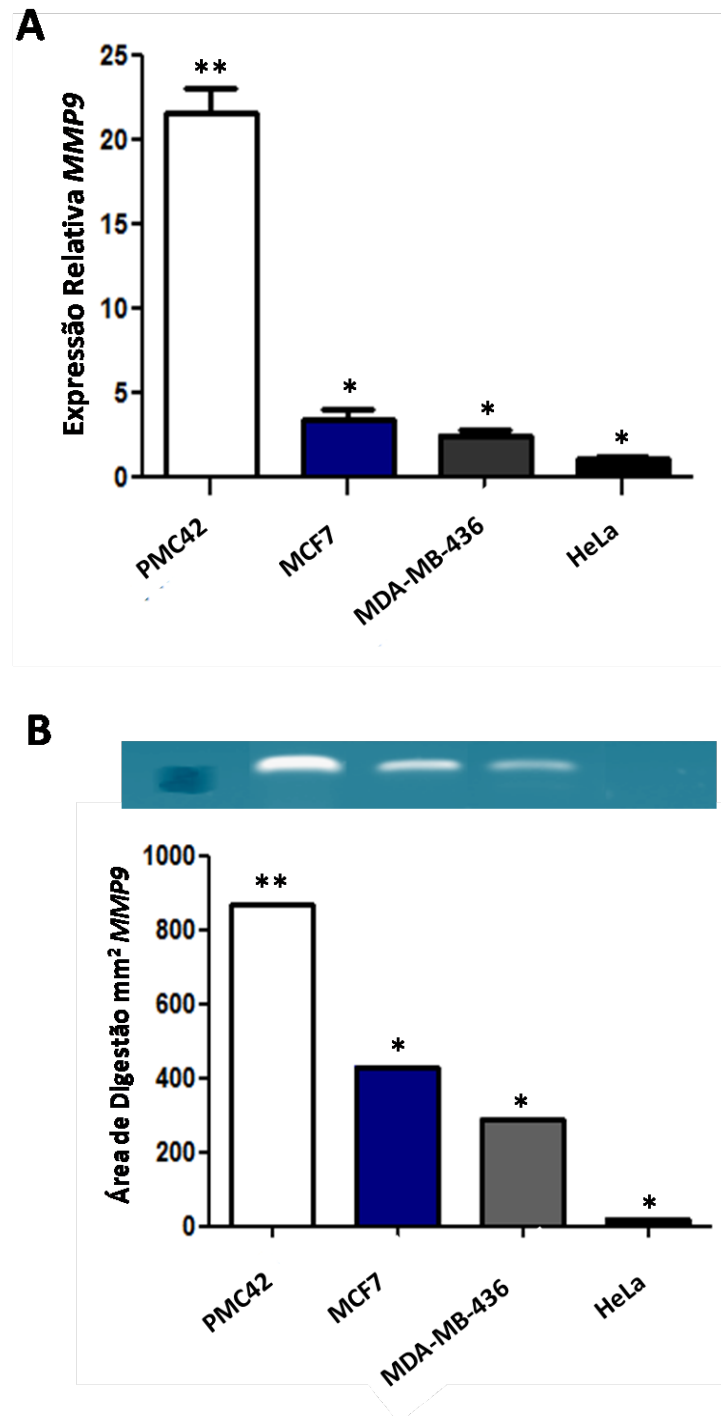
não foram feitos devido a falta de continuidade de financiamento por parte do CNPq. Foram analisadas por imunoprecipitação de cromatina (ChIP) 3 regiões de DNA sendo que duas destas contém importantes locais de ligação para fatores de transcrição já bem estudados na literatura, e a região contendo os CpG 12 a 30. A ChIP foi feita utilizando anticorpos anti H3, H3K4me3 e H3K27me3. Como era esperado a ChIP com H3 não mostrou diferença significativa após a quantificação das regiões escolhidas com ou seu tratamento com 5-azadC (Figura 21). Porém, a marca de histona de abertura de cromatina H3K4me3 mostrou-se significativamente mais alta na condição de tratamento com 5-azadC tanto nos locais reconhecidos como alvos de fatores de transcrição quanto na região dos CpGs 12 a 30. A marca de histona fechada H3K27me3 não apresentou alteração significativa. Estes resultados sugerem que além da desmetilação do DNA, ocorrem modificações de histonas favorecendo a transcrição do gene *MMP9*. E destaca-se a importância da região entre os CpGs 12 a 30 como um provável alvo de modificação molecular, para aumento de expressão do gene *MMP9*.

5.8. Resultados suplementares

Após a obtenção de alguns resultados ou em paralelo aos resultados apresentados foram realizados alguns experimentos tanto com a linhagem PMC42 que expressa altos níveis de MMP-9 quanto com a HeLa que não expressa o gene *MMP9* (Figuras 9 A e B). Foi observado que a CGI1 na linhagem PMC42 possui padrão bem diverso de metilação com um valor médio em torno de 60% de metilação (Figura S1 A). Como esta linhagem expressa muito a proteína MMP-9 não se pode descartar a importância desses CpGs na regulação da expressão desse gene. Por outro lado, os CpGs 12-30 da CGI2 encontram-se também desmetilados corroborando os resultados anteriormente obtidos (Figura S1 B).

O estudo mais detalhado na linhagem HeLa mostrou que 5-azadC também foi capaz de aumentar significativamente a expressão de *MMP9* (Figura S2). Além disso, depois da primeira compilação de resultados onde se observou que a CGI1 estava totalmente metilada mesmo após tratamento com 5-azadC, também foi realizada a clonagem dessa região a partir da linhagem HeLa. Foi observado um perfil similar ao observado nas linhagens de câncer

de mama, com uma sutil desmetilação dessa região após o tratamento com 5-azadC, apresentando um valor médio em torno de 80% de metilação (Figura S3 A). Observamos também um efeito similar em HeLa na CGI2, com desmetilação dos CpGs 12 a 30 (Figura S3 B). Estes resultados reforçam os vistos anteriormente nas linhagens de câncer de mama, pode supor que este efeito pode ser também observado em outros tipos de câncer, tais como o cervical.

FIGURA 9. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE MMP-9 EM LINHAGENS TUMORAIS

A. Quantificação da expressão gênica da *MMP9* em linhagens tumorais. B Acima, atividade enzimática de MMP-9 por zimografia, abaixo, medição da área de digestão mediada por MMP-9. Os asteriscos representam significância estatística: * $p > 0,05$ e ** $p > 0,001$ entre as linhagens.

FIGURA 10. COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO GENE *MMP9* E *RECK* EM LINHAGENS TUMORAIS

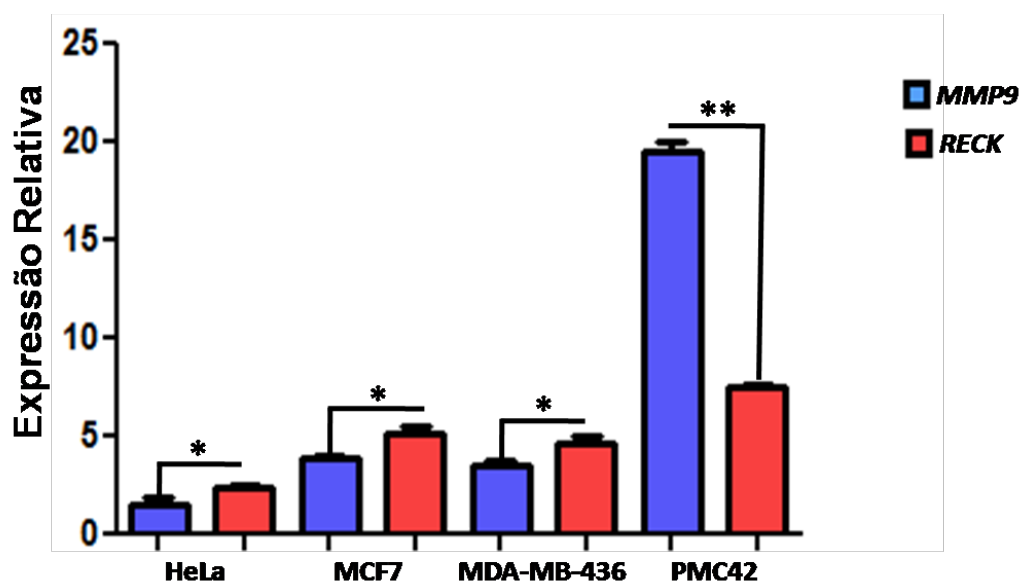
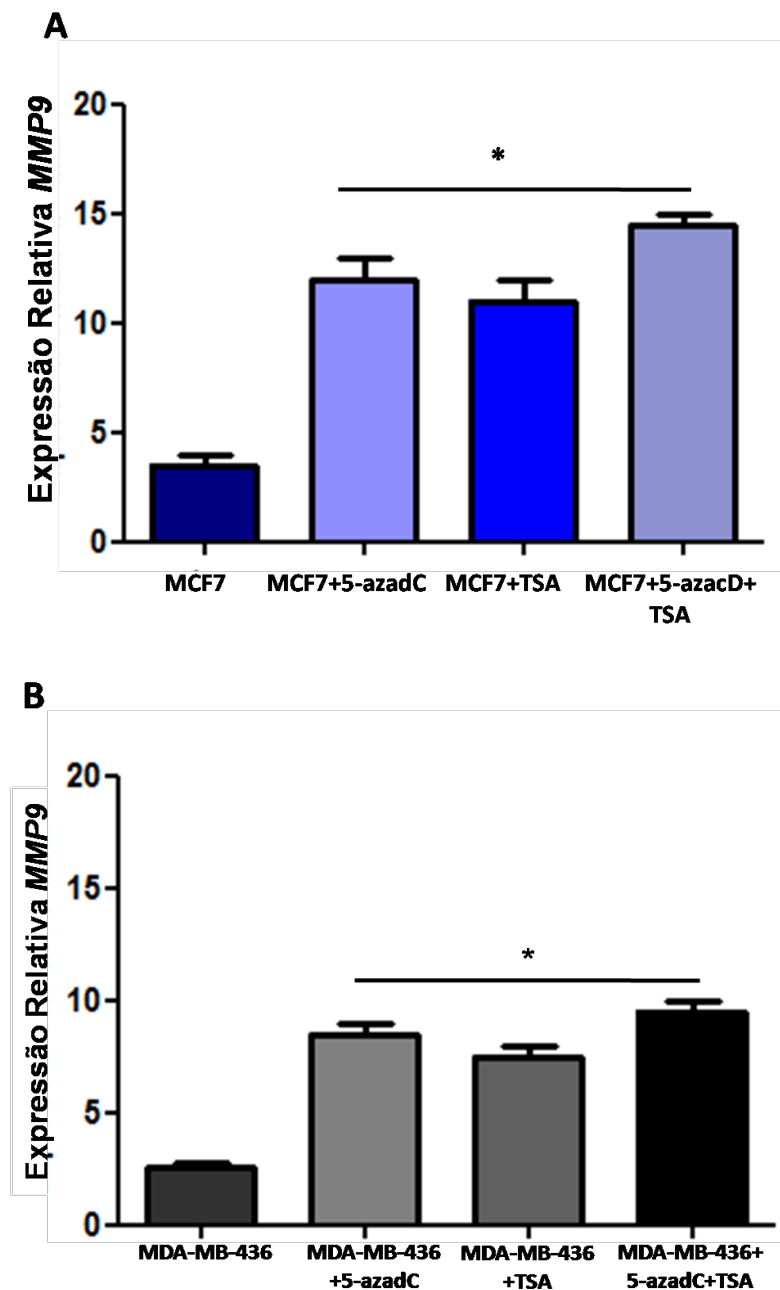


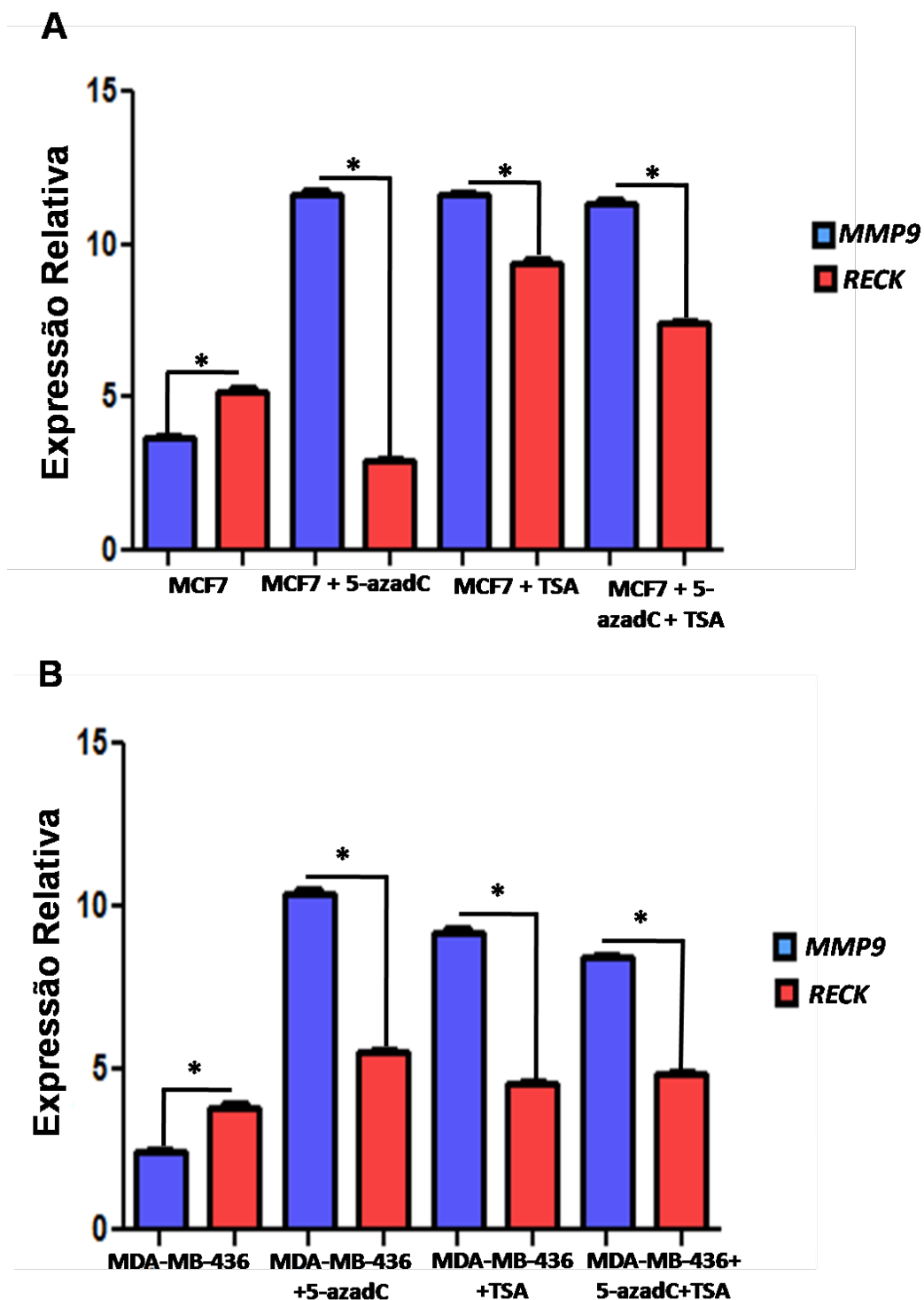
Gráfico de quantificação do gene *MMP9* e do gene *RECK* e sua comparação em linhagens tumorais. Os asteriscos representa significância estatística: * $p > 0,05$ e ** $p > 0,001$ entre as linhagens.

FIGURA 11. EFEITO DE 5-azadC E TSA NA EXPRESSÃO DO GENE *MMP9* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA



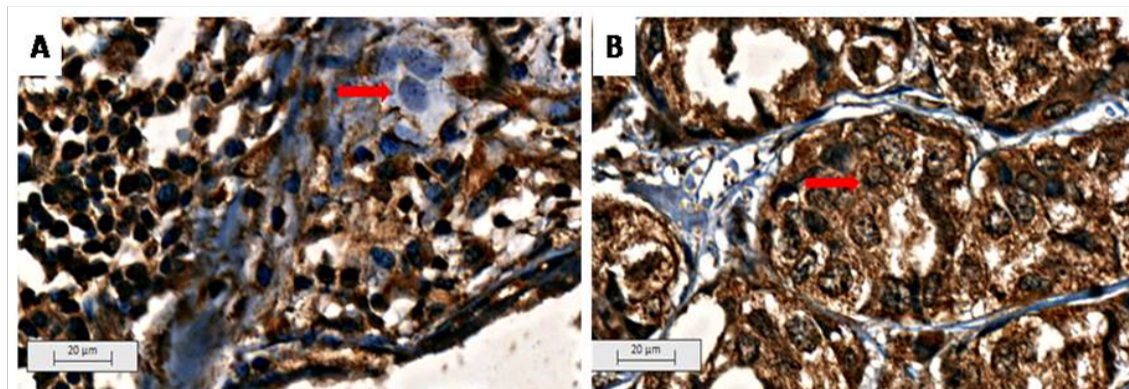
A. Linhagem MCF7 com e sem tratamentos com 5-azadC e TSA e a expressão do gene *MMP9*.
 B. Linhagem MDA-MB-436 com e sem tratamentos com 5-azadC e TSA e a expressão do gene *MMP9*. O asterisco representa significância estatística: $p > 0,05$ entre as linhagens.

FIGURA 12. EXPRESSÃO DOS GENES *MMP9* E *RECK* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA COM E SEM TRATAMENTO COM 5-azadC E TSA

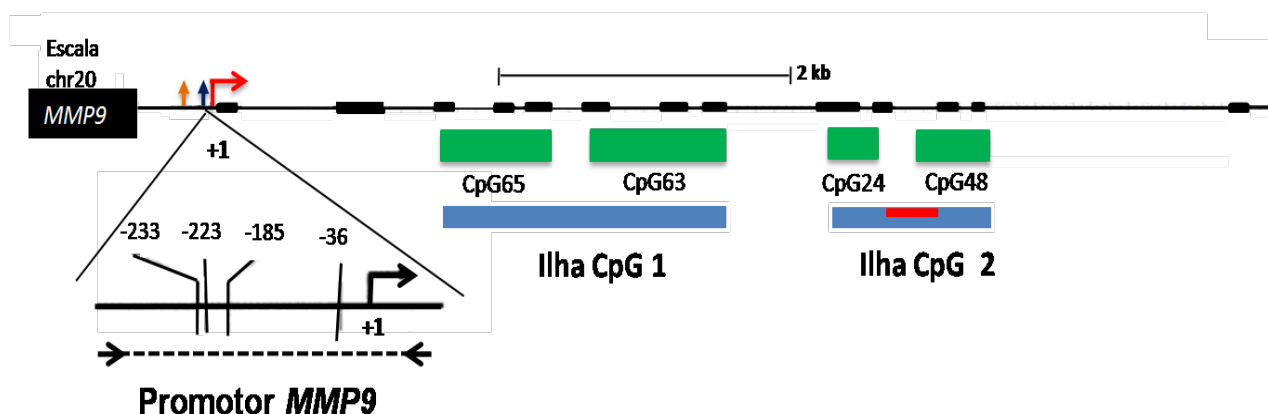


A. Expressão relativa de *MMP9* (azul) e *RECK* (vermelho) após tratamento com 5-azadC e TSA na linhagem MCF7. B. Expressão relativa de *MMP9* (azul) e *RECK* (vermelho) após tratamento com 5-azadC e TSA na linhagem MDA-MB-436. O asterisco representa significância estatística: $p > 0,05$ entre os tratamentos.

FIGURA 13. IMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9 EM TUMORES DE MAMA

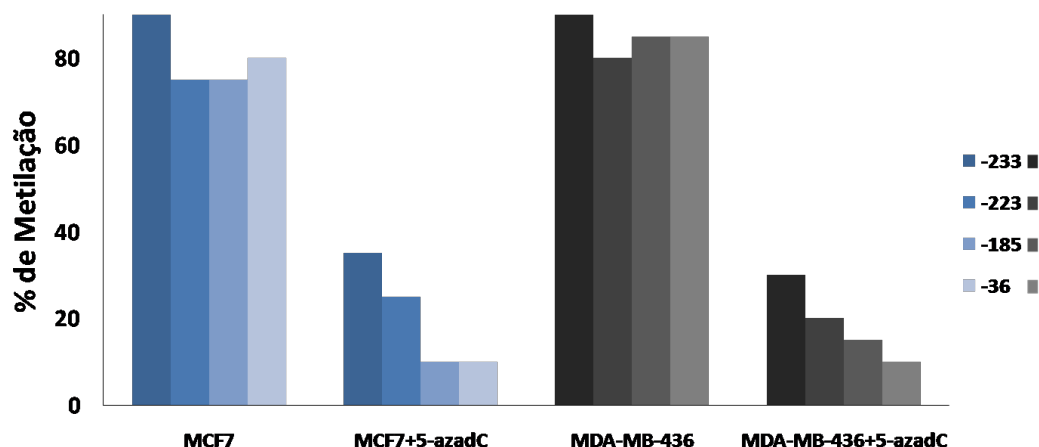


A. Tumor de mama negativo para MMP-9 indicados pela seta vermelha. B. Tumor de mama positivo para MMP-9 indicado pela seta vermelha.

FIGURA 14. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO GENE *MMP9*

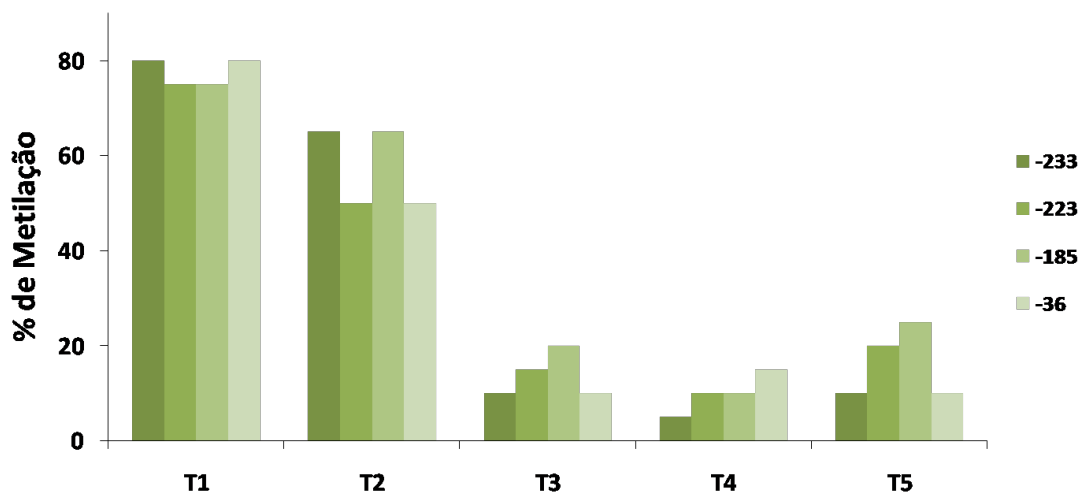
O gene *MMP9* possui 13 éxons (caixas pretas). Abaixo em verde estão mostradas as ilhas de CpG conforme mostrado no site do programa Human Blat (os números representam a quantidade de CpG em cada ilha). Em azul mostra-se a denominação utilizada neste trabalho para a clonagem e sequenciamento das ilhas de CpG denominadas aqui de ilha de CpG 1 e 2. A flecha vermelha mostra o início de transcrição. Próximo a esta flecha duas setas indicam os locais de ligação dos fatores de transcrição NFκB (laranja) e AP1 (azul). Abaixo uma ampliação da região promotora mostra os 4 CpGs envolvidos na regulação da expressão de *MMP9*. O traço vermelho na Ilha de CpG 2 corresponde aos CpGs 12 a 30.

FIGURA 15. PERFIL DE METILAÇÃO DE CPGS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP9* EM LINHAGENS TUMORAIS



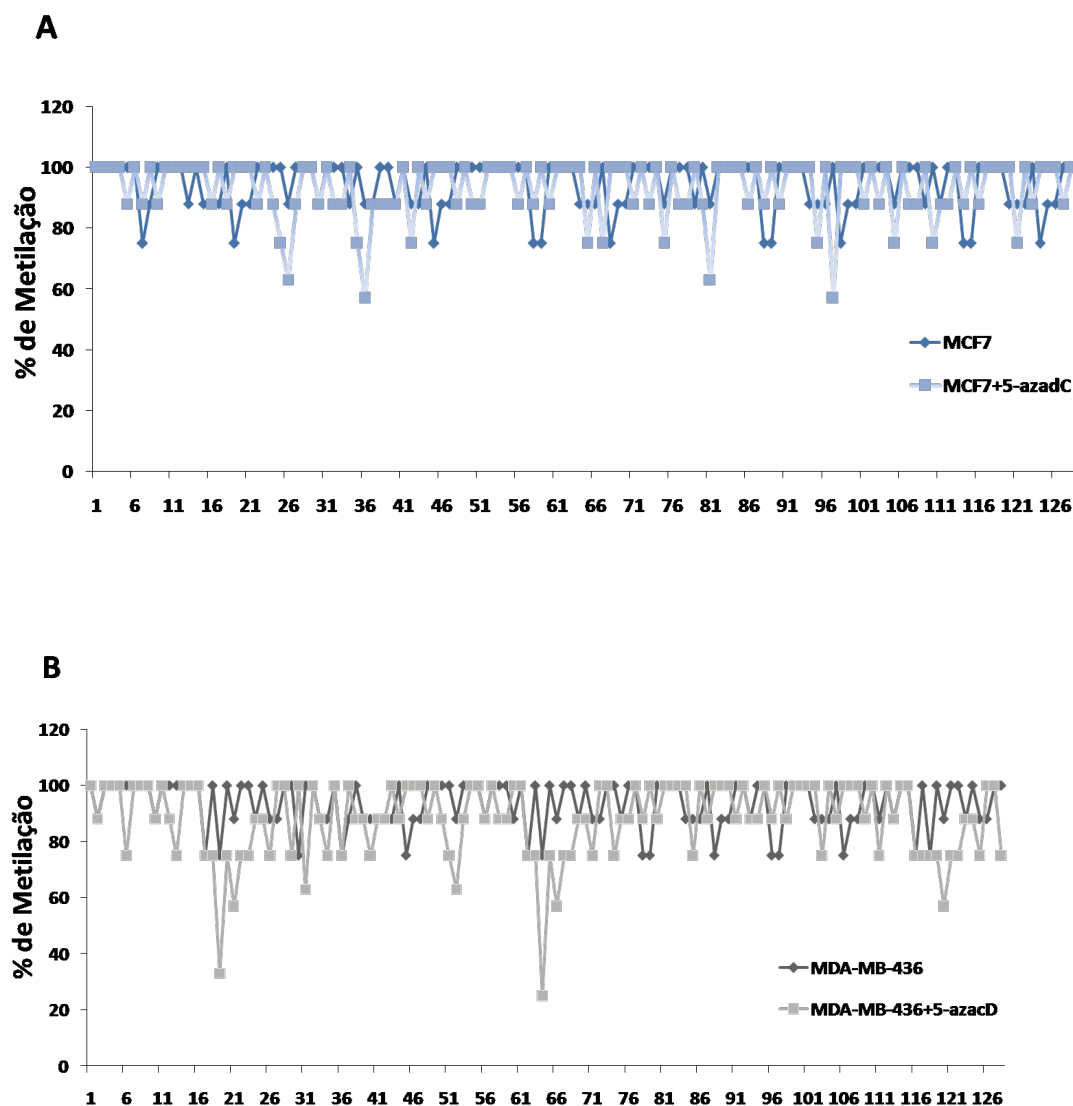
Percentagem de metilação de 4 CpGs localizados na região promotora do gene *MMP9* antes e depois do tratamento com 5-azadC na linhagem MCF7 (azul) e MDA-MB-436 (cinza). Cada barra representa um CpG como pode ser visto a numeração ao lado.

FIGURA 16. PERFIL DE METILAÇÃO DE CpGs NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP9* EM TUMORES DE MAMA



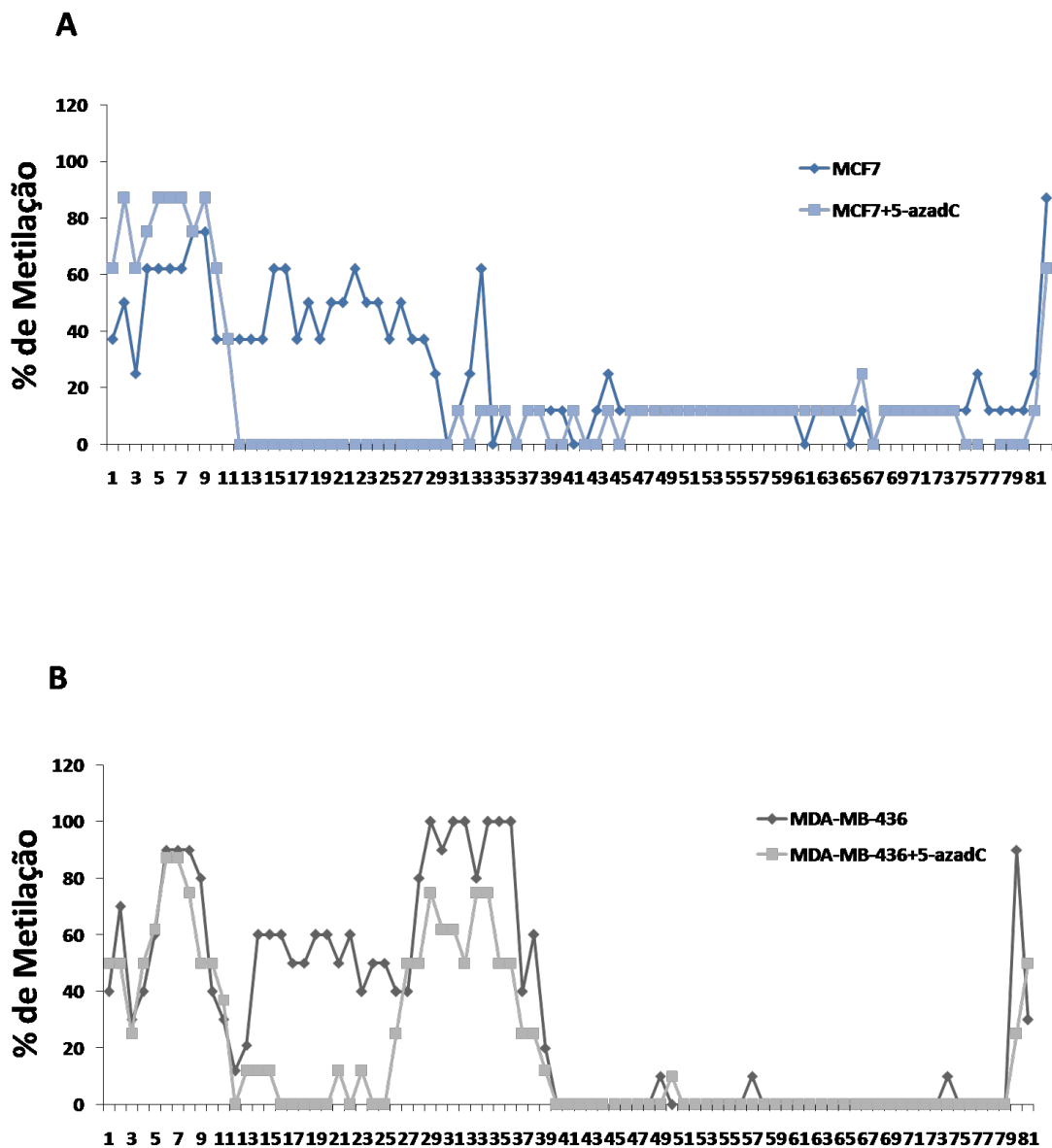
Os CpGs -233, -223, -185 e -36 (cada tom de verde se refere a um CpG como pode ser visto do lado direito) foram sequenciados e foram obtidos as percentagens de metilação em 5 amostras de câncer de mama. T1 e T2 são *MMP-9* negativo, T3, T4 e T5 são *MMP-9* positivo na Imunohistoquímica.

FIGURA 17. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI1 DO GENE *MMP9* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA



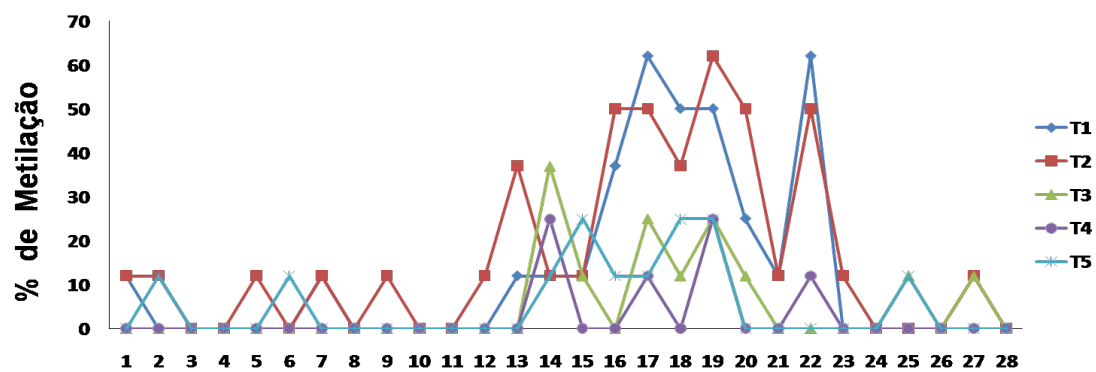
A. A CGI1 do gene *MMP9* mostrado na linhagem MCF7 não tratada (azul claro) ou tratada com 5-azadC foi sequenciada e calculada a percentagem de metilação de cada CpG. B. O mesmo para a linhagem MDA-MB-436 não tratada (preto) ou tratada com 5-azadC (cinza)

FIGURA 18. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI2 DO GENE *MMP9* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA



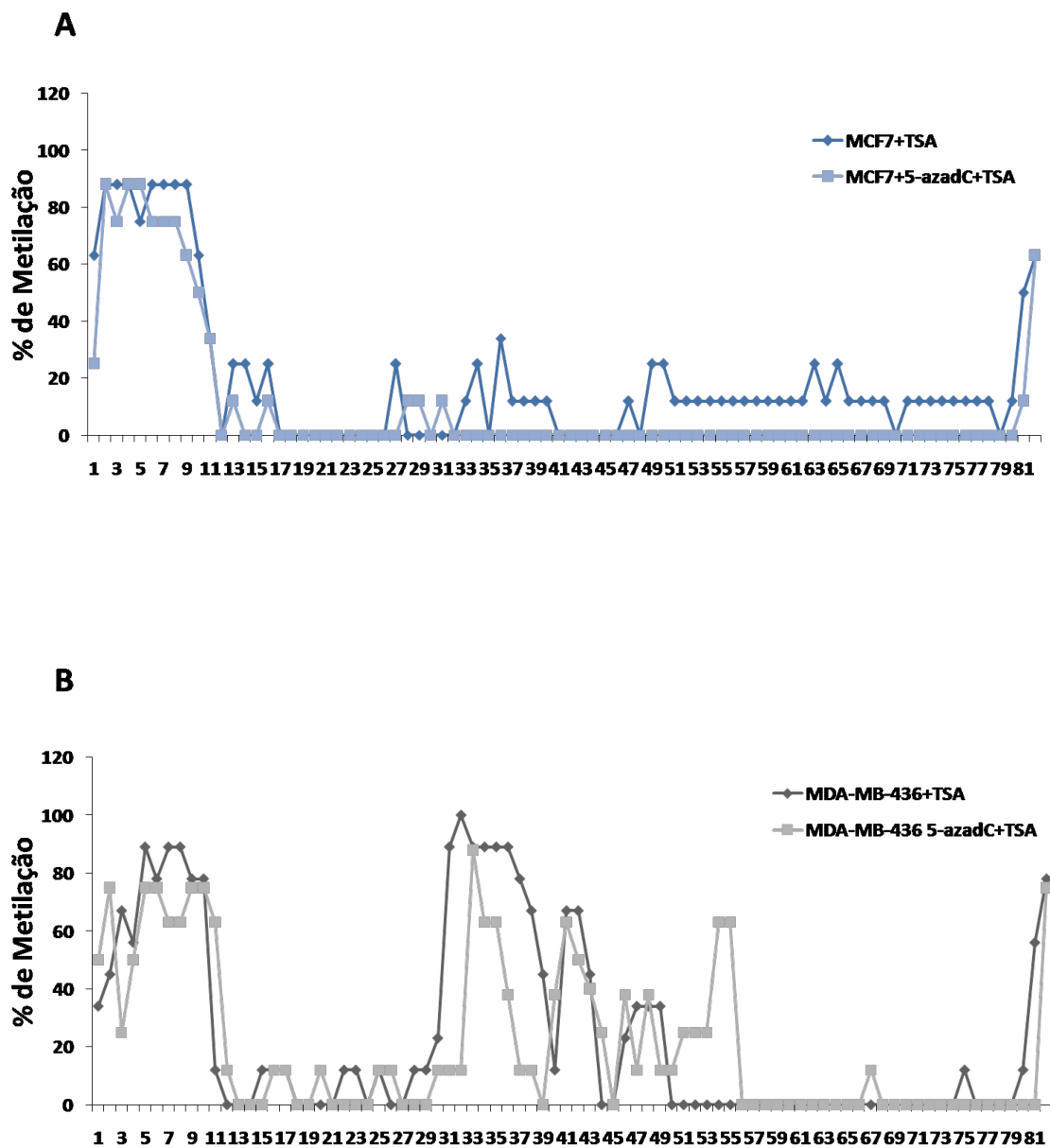
A. A CGI2 do gene *MMP9* na linhagem MCF7 não tratada (azul escuro) ou tratada (azul claro) com 5-azadC foi sequenciada e calculada a percentagem de metilação de cada CpG. B. O mesmo para a linhagem MDA-MB-436 não tratada (preto) ou tratada com 5-azadC (cinza).

FIGURA 19. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI2 (CpG 12-30) DO GENE *MMP9* EM TUMORES DE MAMA

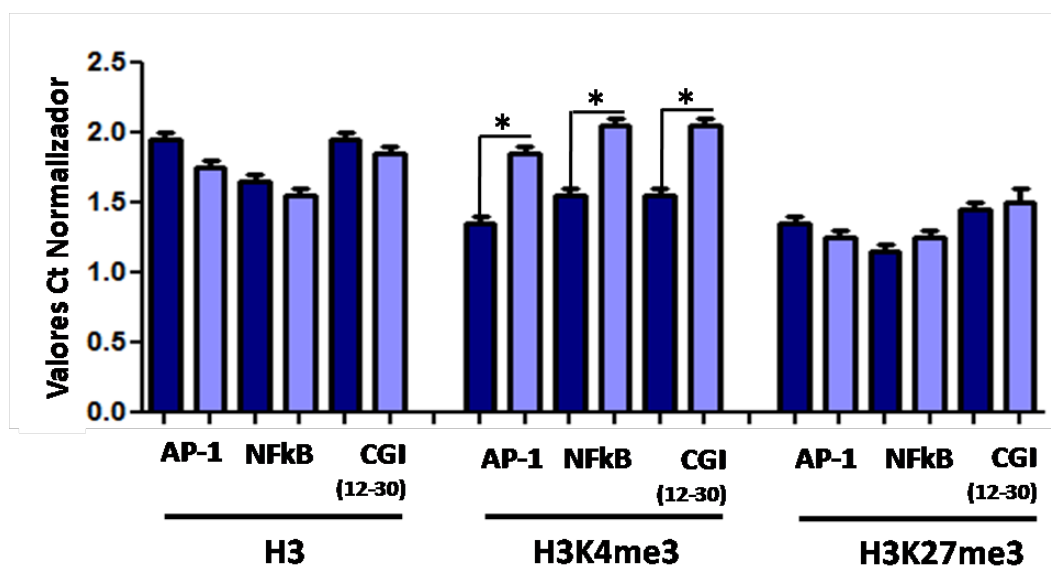


Percentagem de metilação de CpGs 12-30 da CGI2 em tumores de mama (T1 a T5).

FIGURA 20. PERFIL DE METILAÇÃO DA CGI2 DO GENE *MMP9* COMPARANDO 5-azadC E TSA EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

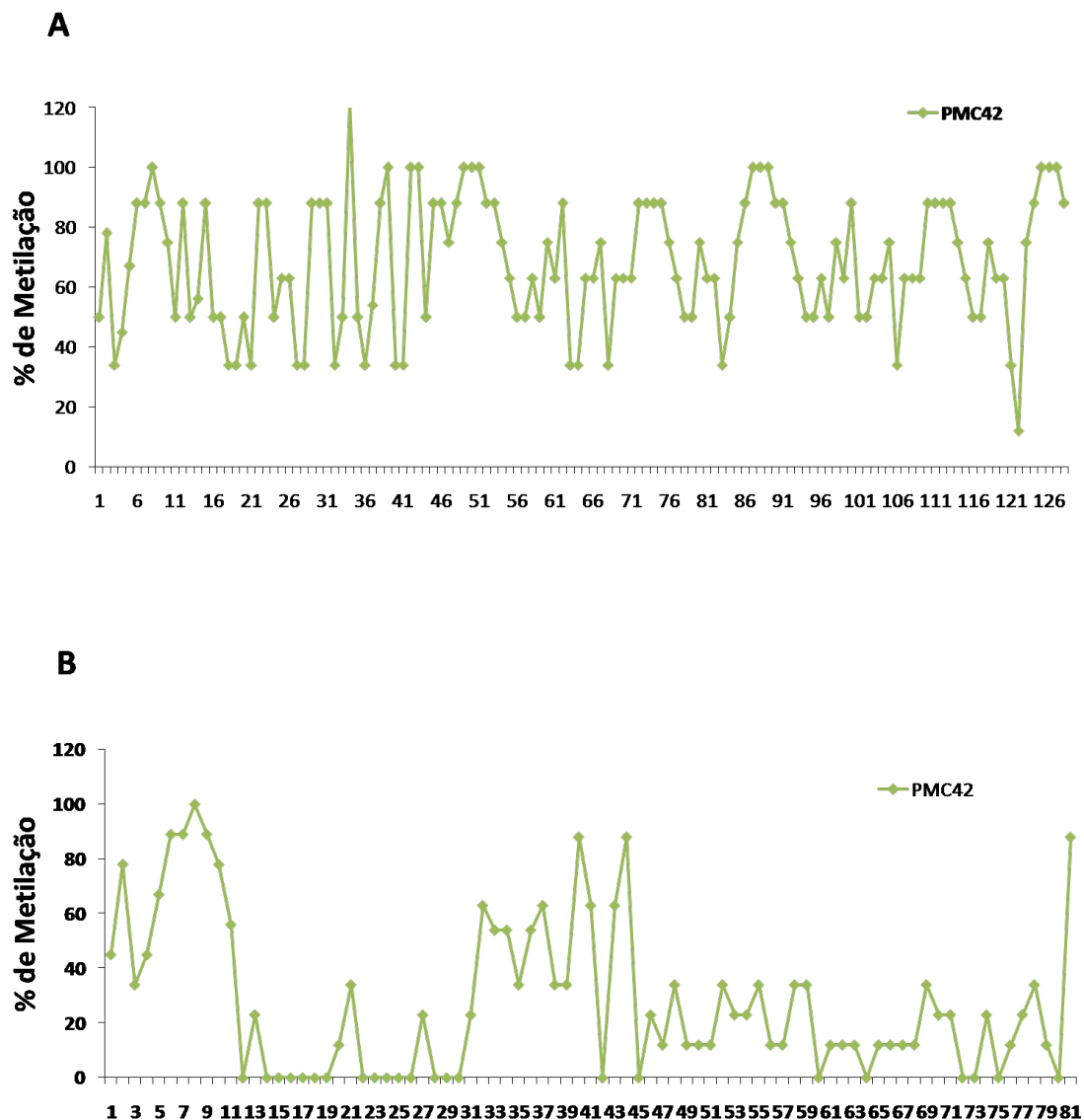


A. MCF7 após o tratamento com TSA (azul escuro) e 5-azadC mais TSA (azul claro). B. MDA-MB-436 após o tratamento com TSA (preto) e 5-azadC mais TSA (cinza).

FIGURA 21. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA

Imunoprecipitação da cromatina (ChIP) da linhagem MCF7 antes (azul escuro) e depois (azul claro) do tratamento com 5-azadC. As ChIPs foram feitas com anticorpo anti H3, H3K4me3 e H3K27me3. A seguir foram amplificadas regiões de ligação dos fatores de transcrição AP-1 e NFkB no promotor e na região dos CpGs 12-30 da CGI2. O asterisco representa significância estatística: $p < 0,05$ entre as regiões.

FIGURA S1. SEQUENCIAMENTO DA CGI1 E CGI2 DO GENE *MMP9* EM LINHAGEM PMC42



A. Gráfico do percentual de metilação da CGI1 do gene *MMP9* na linhagem PMC42. B. Gráfico do percentual de metilação da CGI2 do gene *MMP9* na linhagem PMC42.

FIGURA S2. EFEITO DO TRATAMENTO DA LINHAGEM DE TUMOR CERVICAL HELA COM 5-azadC NA EXPRESSÃO DO GENE *MMP9*

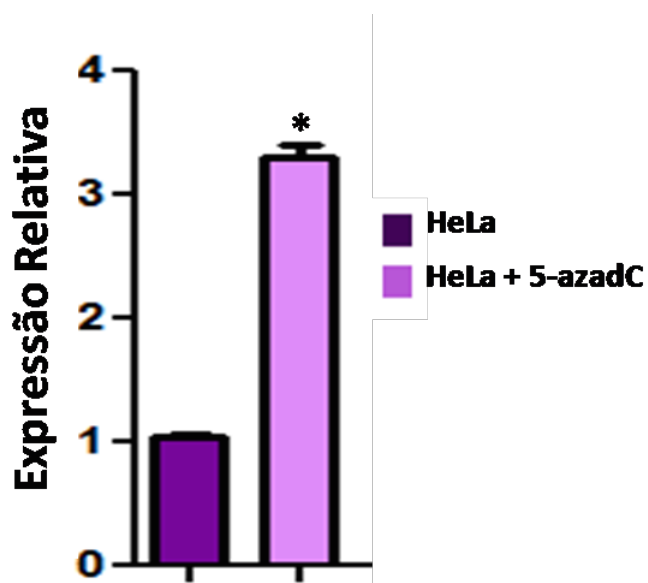
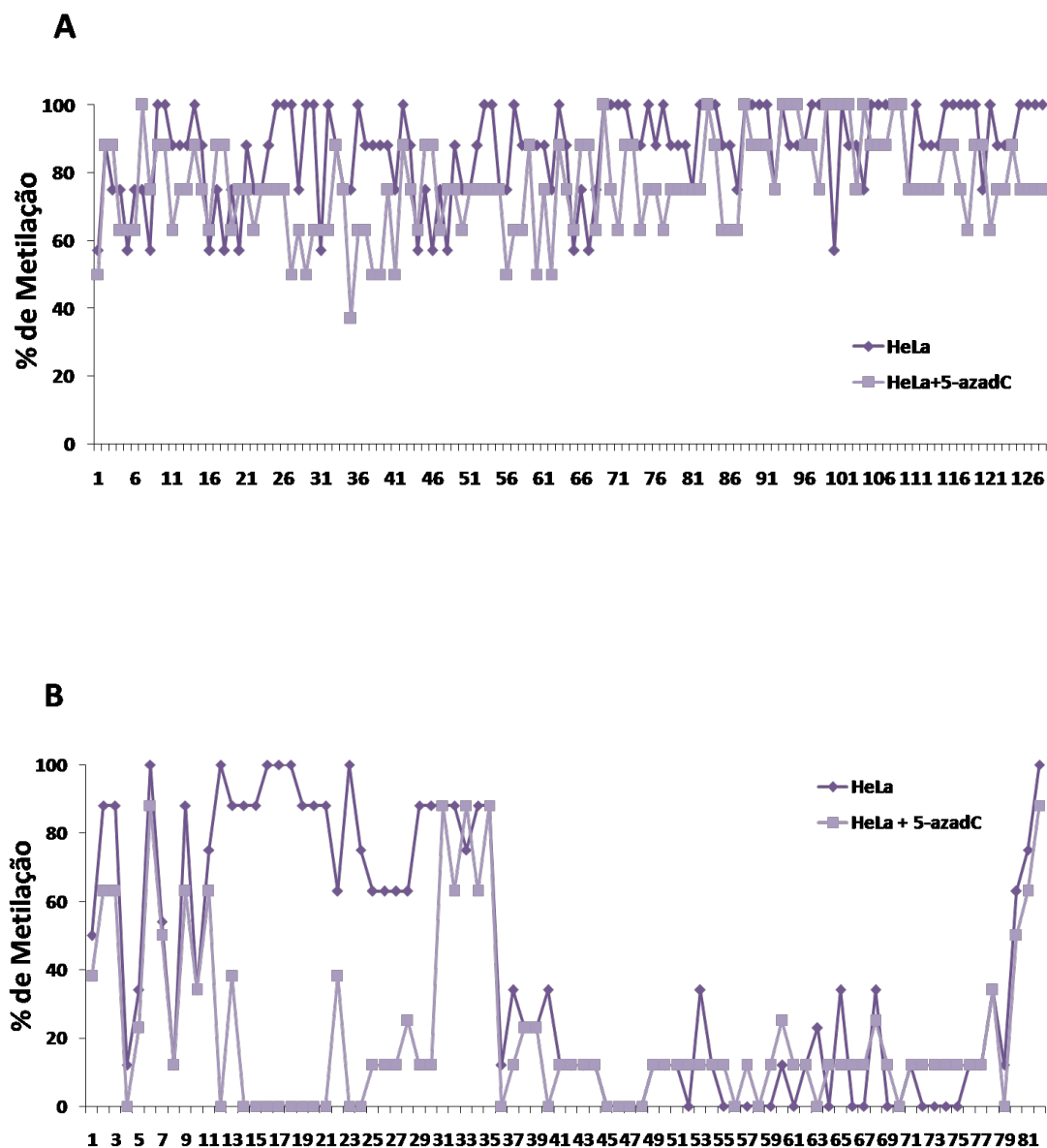


Gráfico da expressão do gene *MMP9* na linhagem HeLa sem (roxo escuro) e com tratamento com 5-azadC (roxo claro). O asterisco representa significado estatístico: $p > 0,05$ entre a linhagem tratada com a linhagem sem tratamento.

FIGURA S3. SEQUENCIAMENTO DA CGI1 E CGI2 DO GENE *MMP9* EM LINHAGEM HELA COM E SEM TRATAMENTO COM 5-azadC



A. Percentagem de metilação da CGI1 do gene *MMP9* em HeLa sem (roxo escuro) e com tratamento (roxo claro) com 5-azadC. B. Percentagem de metilação da CGI2 do gene *MMP9* em HeLa sem (roxo escuro) e com (roxo claro) tratamento com 5-azadC.

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o mais comum e a segunda causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo. Porém a morte não ocorre devido ao tumor na mama, mas sim em decorrência das metástases. As metástases iniciam em um estágio ainda não bem definido, entretanto podem ocorrer muito antes da detecção do tumor primário. Por essa razão quanto antes ocorrer o diagnóstico inicial, melhores são as chances de não terem ocorrido a disseminação de células tumorais para os pulmões, ou ossos ou ainda para o fígado. Quando ocorre a disseminação, as células tumorais secundárias podem permanecer por muito tempo em um estado de dormência. Por isso muitas vezes mesmo depois de alguns anos do aparecimento do tumor na mama, ainda podem surgir metástases. Como ou porque ocorre o estado de dormência ainda é desconhecido (Klein *et al.*, 2009).

Sabe-se que uma importante etapa para o surgimento das metástases é a produção pelas células tumorais de metaloproteases. Dentre essas enzimas a MMP-2 e a MMP-9 são as mais estudadas. Nosso grupo já vinha estudando o promotor do gene *MMP2* na linhagem tumoral MCF7 que não expressa esse gene, e enquanto preparávamos o estudo da regulação epigenética por metilação do DNA no promotor de *MMP2*, nosso ineditismo foi superado por Chernov (Chernov *et al.*, 2009). Mesmo assim, continuando nossos estudos encontramos uma peça chave no elaborado mecanismo de ativação da enzima MMP-2. Encontramos um novo mecanismo de ativação do gene *MMP2* através da desmetilação do seu promotor quando a proteína de matriz extracelular, a fibronectina é adicionada ao meio de cultivo na linhagem MCF7 (Pereira *et al.*, 2014) (ver no anexo). Além da desmetilação do promotor, o aumento das marcas de abertura de cromatina H3K4me3 também foram encontradas. Uma característica importante a ser destacada é que a ilha de CpG do gene *MMP2*, que apresenta regulação por metilação encontra-se dentro da região 5'UTR. Enquanto realizávamos este estudo, em paralelo também vínhamos estudando o gene *MMP9* devido ao seu reconhecido envolvimento no processo de produção de metástases em diversos tipos de câncer. A primeira etapa foi o estudo *in silico* que mostrou ausência de ilhas de CpG na região 5'UTR, contudo 4 ilhas estavam presentes dentro do corpo do gene. Sabia-se aquela

altura que essa localização aparentemente pouco comum de ilhas de CpG, poderiam ser importantes para expressão gênica (Kulis *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). À partir da análise de literatura constatamos que alguns estudos já haviam demonstrado a importância da metilação do DNA na regulação da expressão de *MMP9* porém tendo como foco o estudo de alguns CpGs localizados dentro da região 5'UTR (Roach *et al.*, 2005). Aquele momento o estudo epigenético para a regulação da expressão de *MMP9* era focado nas modificações de histonas (Farina e Mackay, 2014). A partir desses dados começamos as primeiras etapas de estudo da importância da metilação do DNA para regulação da expressão do gene *MMP9*. Além disso um dado da literatura chamou muito a atenção devido à crítica relatada do uso de agentes desmetilantes de DNA. O uso de 5-aza-2'-desoxicitina ou decitabine (nome comercial Dacogen) é muito importante na terapia de síndrome mielodisplásica e leucemias. Porém um estudo mostrava que esse composto era capaz de ativar a expressão de *MMP9* (Bernal *et al.*, 2013). Então devido a esta informação e também por esse composto ser utilizado como protocolo padrão para discriminar o efeito da metilação do DNA, como provável regulador de expressão gênica, incluímos o decitabine no estudo. Além disso é de uso comum a inclusão de inibidores de desacetilação de histonas (inibidores de HDAC) em estudos epigenéticos, por isso utilizamos também o trichostatin A (Sun e Tsao) nos tratamentos (Sun e Tsao, 2008).

O primeiro desafio foi encontrar uma linhagem tumoral de mama que tivesse baixos níveis de expressão do gene *MMP9*. Na nossa experiência em paralelo com a enzima MMP-2 com a zimografia, sabíamos de antemão que a proteína MMP-9 estava presente no sobrenadante de culturas de MCF7 e PMC42. Então procuramos exaustivamente uma linhagem que não expressasse o gene *MMP9* para poder usar como controle ou como parâmetro de expressão basal relativa. Contudo, as demais linhagens de câncer de mama do laboratório expressavam *MMP9*. Em busca na literatura, a única linhagem que poderíamos conseguir naquele momento foi a de câncer cervical, HeLa (Roomi *et al.*, 2009). Com a inclusão desta linhagem foi possível observar que de fato MCF7 e MDA-MB-436 expressam o gene *MMP9*, porém em baixíssimos níveis, quando comparados aos valores da linhagem PMC42, que expressa em torno de 20 vezes mais (Figura 9A). Além disso nossa análise de zimografia também ficou mais fácil de ser avaliada e as bandas observadas (Figura 9 B) faziam

mais sentido e comprovavam que a expressão gênica era compatível com a atividade proteica. Sabendo que a proteína MMP-9 pode ser regulada pós-traducionalmente pela proteína RECK, avaliamos também a expressão do gene *RECK* (Figura 10). Foi observado que o gene *RECK* é um pouco mais expresso do que o gene *MMP9* (porém estatisticamente significativo) nas linhagens HeLa, MCF7 e MDA-MB-436 sendo que única inversão nesse perfil foi visto na linhagem PMC42. À partir desses dados foram feitos os tratamentos das linhagens MCF7 e MDA-MB-436 com 5-azadC e pudemos constatar que este agente desmetilante foi capaz de aumentar significativamente a expressão de *MMP9* nestas linhagens (Figura 11 A e B). Além disto, o inibidor de HDAC também foi capaz de aumentar a expressão desse gene. Contudo, quando colocados em conjunto 5-azadC e TSA, não foi observado um efeito aditivo como poderia ser esperado (Figura 11 A e B). Este resultado provavelmente se deve ao fato de que ambos compostos 5-azadC e TSA são drogas antitumorais, que tem por objetivo principal, conduzir a desmetilação de genes supressores de tumor e abertura de cromatina respectivamente. A nossa proposta para explicar porque em conjunto 5-azadC e TSA não aumentaram sinergicamente *MMP9* se deve ao fato de que TSA é muito tóxico. Este composto só pode ser usado por 16 horas nas culturas, então quando colocados juntos, agente desmetilante e inibidor de HDAC praticamente todas as células sensíveis morrem, restando apenas aquelas que, apesar do tratamento não sofreram ou desmetilação ou inibição de HDAC. Nestas mesmas, amostras tratadas com 5-azadC e TSA não houve aumento significativo da expressão do gene *RECK* (Figura 12 A e B). Portanto os altos níveis da enzima MMP-9 produzida por MCF7 e MDA-MB-436 depois do tratamento com 5-azadC, provavelmente não seja passível de inibição mediada pela proteína RECK.

A partir destes dados concluímos que seria de fato importante avaliar o efeito de 5-azadC e TSA e o provável efeito de desmetilação do DNA, nos diversos CpGs distribuídos ao longo do gene *MMP9*. Iniciamos essa abordagem para a região promotora do gene com o uso de digestão de DNA seguido de PCR, como já havia sido realizado na osteoartrite por Roach et al., (2005). Porém não conseguimos reproduzir a técnica em DNA de linhagens de câncer de mama. Talvez isso tenha ocorrido devido a diversidade de metilação em linhagens tumorais. Como pode ser visto a Figura 15 não há 100% de

metilação em nenhum dos 4 CpGs assim como não há total desmetilação do DNA depois dos tratamentos. Portanto não foi possível distinguir as amostras quanto a desmetilação após os tratamentos utilizando essa metodologia. Talvez na osteoartrite exista uma situação mais definida em que seja possível usar essa metodologia. Em continuidade, resolvemos analisar esta região por sequenciamento de DNA. Para isso amplificamos e clonamos a região promotora desse gene contendo os CpGs -233, -223, -185 e -36 (Figura 14). Foi observado que estes 4 CpGs estão metilados nas linhagens MCF7 e MDA-MB-436, porém após o tratamento com 5-azadC todos diminuíram drasticamente a percentagem de metilação (Figura 15). A partir destes resultados foi incluído no estudo algumas amostras de tumores de mama de pacientes sendo duas com expressão negativa de MMP-9 (T1 e T2) e três com expressão positiva (T3, T4 e T5) observado após o ensaio de imunohistoquímica. Apesar do pequeno número de amostras foi importante estudar o perfil de metilação em amostras de pacientes para que se pudesse excluir qualquer efeito relativo ao uso de linhagens. E como já havíamos observado nas 2 linhagens tumorais, os 4 CpGs apresentaram-se altamente metilados nas amostras T1 e T2 (negativas para MMP-9) e pouco metilados nas amostras T3, T4 e T5 (Figura 16). Deste modo a metilação do promotor de *MMP9* encontra-se inversamente correlacionado com a expressão de proteína MMP-9 em câncer de mama.

A primeira evidência de que seria importante a metilação do DNA em CpGs específicos no promotor do gene *MMP9* foi vista por Chicoine *et al.*, (2002). Neste estudo foram utilizadas linhagens de linfoma murino positivas e negativas para MMP-9 e o tratamento com 5-azadC confirmou a importância da metilação do DNA como mecanismo de regulação transcricional. A metilação do DNA também foi evidenciada como mecanismo de regulação da produção de MMP-9 em linhagens de tumor de pâncreas (Sato *et al.*, 2003). Em um estudo envolvendo a artrite reumatóide Roach *et al.*, (2005) foram avaliados os mesmos CpGs estudados por Chicoine e observaram que nem todos eram igualmente susceptíveis a perda de metilação, sendo que, alguns CpGs podiam estar uniformemente metilados enquanto outros geralmente estavam desmetilados. A partir destes dados, foi que escolhemos os 4 CpGs, que se mostraram mais metilados em controles saudáveis com baixa expressão de MMP-9 e mais desmetilados em pacientes com osteoartrite

(Roach *et al.*, 2005). Além disso, em um outro estudo utilizando linhagens leucêmicas tratadas com azacitidine (outro análogo como o decitabine) foi observado aumento da expressão de MMP-9 (Bernal *et al.*, 2013). Concluímos portanto, com nossos resultados, que a metilação do promotor é um fator de extrema importância para regulação da expressão de MMP-9 em câncer de mama assim como já observado em outras patologias.

A próxima etapa foi esclarecer se as ilhas de CpG observadas no corpo do gene *MMP9* poderiam ter funcionalidade na regulação de sua expressão. Para isto foi feito o planejamento da clonagem das 4 ilhas de CpG em duas etapas mostrando os resultados em 2 grupos, CGI1 e CGI2 (Figura 14). A CGI1 mostrou-se altamente metilada tanto na linhagem MCF7 quanto MDA-MB-436 (Figura 17 A e B) e mesmo após tratamento com 5-azadC não houve uma drástica alteração no perfil de metilação. Esta região portanto se mostrou independente da metilação do promotor e provavelmente não é envolvida na regulação da expressão de *MMP9*. Nós já havíamos constatado no estudo com o gene *MMP2* que 5-azadC não é capaz de desmetilar o promotor desse gene (Pereira *et al.*, 2014). Alguns autores sugerem que nesses lugares a depleção das DNMTs pelo decitabine é seletiva, ou que alguns locais são mais resistentes a desmetilação (Chik e Szyf, 2011). Um outro recente trabalho avaliou a associação da superexpressão de *MMP9* com a hipermetilação intragênica em linhagens de melanoma. Neste estudo foi avaliado um *hotspot* (alguns CpG individuais metilados) no final da CGI1 que havia sido previamente encontrado na linhagem MCF7 (dados obtidos a partir do projeto ENCODE (Consortium, 2012)) (Falzone *et al.*, 2016). No nosso estudo esta mesma região está de fato hipermetilada, mas não encontramos correlação com os níveis de metilação diferencial nesta linhagem. Por outro lado a CGI2 possui a maioria dos CpGs desmetilados e que não se alteram após o tratamento com 5-azadC. Somente alguns CpGs entre 12 e 30 estão metilados nas linhagens MCF7 e MDA-MB-436 e são desmetilados após o tratamento com 5-azadC (Figura 18 A e B). A busca de sítios para ligantes ativadores de transcrição nessa região mostrou um provável ligante relacionado ao CpG número 20 que contém um sítio para ligação do fator de transcrição CTCF (dados não mostrados). Diversos estudos relatam que sítios CTCF em regiões intragênicas contendo CpGs desmetilados podem favorecer a produção de um transcrito alternativo (Kulis *et al.*, 2013). Podemos nesse momento especular

que esta região dentro do gene *MMP9* seja um provável sítio de transcrição alternativo. Esta região contendo os CpGs 1 a 30 foi então clonada e sequenciada utilizando os 5 tumores de mama do estudo. Os tumores T1 e T2 que não expressam MMP-9 apresentaram alta densidade de metilação entre os CpGs 12 a 30. O inverso foi observado para os tumores T3, T4 e T5 que expressam MMP-9 (Figura 19). Portanto os CpGs 12 a 30 na CGI2 podem estar envolvidos na regulação da expressão do gene *MMP9* em câncer de mama.

A fim de complementar os dados até aqui obtidos foi estudada a linhagem PMC42 que expressa altos níveis de MMP-9. E foi observada a densa metilação na CGI1 e o oposto na CGI2 (Figura S1 A e B) corroborando os resultados obtidos. Além disso avaliando a linhagem HeLa foi observado que ocorre o aumento da expressão de *MMP9* depois do tratamento com 5-azadC (Figura S2). A CGI1 mostrou-se altamente metilada mesmo após tratamento com 5-azadC (Figura S3 A) e a CGI2 apresentou perfil de metilação similar ao observado na linhagens de câncer de mama (Figura S3 B). Em conjunto esses dados mostram que provavelmente as conclusões obtidas para o câncer de mama podem ser extrapoladas para tumor cervical.

A correlação negativa entre a expressão gênica e a metilação de ilhas de CpG já é bem estudada na literatura. Entretanto essa associação não pode ser extrapolada para outros contextos genômicos tais como ilhas de CpG localizadas no corpo do gene. Estas ilhas de CpG tem sido denominadas de ilhas órfãs justamente para expressar a incerteza sobre o seu significado na expressão gênica (Deaton e Bird, 2011). Diversos estudos tem indicado que a metilação diferencial em regiões intragênicas poderiam ter um importante papel na transcrição e diferenciação celular (Ehrlich e Lacey, 2013). Tem sido proposto algumas hipóteses para a funcionalidade das ilhas de CpG intragênicas (CGIs), tais como regulação da forma da cromatina, inibição da expressão de elementos transponíveis ou transposons, a prevenção da expressão de transcritos a partir de diferentes inícios de transcrição, bem como de formas alternativas de transcritos (Kulis *et al.*, 2013). Recentemente, Shenker *et al.*, (2015) estudou uma linhagem de câncer de mama receptor de estrogênio (RE) positivo que possui o promotor do gene *ESR1* desmetilado e regiões intragênicas metiladas. Depois do tratamento com 5-azadC foi possível observar a inibição da expressão do gene do receptor de estrogênio (*ESR1*) e

desmetilação da região intragênica, ou seja, curiosamente 5-azadC silenciou o gene *ESR1* desmetilando uma região intragênica (Shenker *et al.*, 2015). Portanto ainda há muito a ser compreendido em termos de regulação da expressão gênica além dos promotores e regiões intragênicas. No nosso estudo nós propomos que a metilação de CpGs dentro do corpo do gene, especificamente nos CpGs 12 a 30 pode ser importante durante a carcinogênese em mama sendo que mais estudos são necessários para concluir quais são as implicações desse achado para condições fisiológicas e de doença.

Sabe-se que além da metilação do DNA, modificações de marcas de histonas são importantes na regulação da expressão gênica. Assim sendo, utilizamos a linhagem MCF7 com e sem tratamento com 5-azadC e através da imunoprecipitação de cromatina para as marcas de abertura H3K4me3 e fechamento H3K27me3. Nossos parâmetros de controle foram os locais de ligação dos fatores de transcrição NFkB e AP1 no promotor de *MMP9*, já descritos na literatura (Cock-rada *et al.*, 2013) e a região contendo os CpGs 12-30 (Figura 14). A análise quantitativa desses 3 locais do gene *MMP9* foi similar na ausência do tratamento com 5aza-dC. Por outro lado a marca de abertura, H3K4me3 que representa abertura da cromatina para transcrição, foi significativamente mais alta após o tratamento com 5-azadC nos sítios de ligação NFkB e AP1 e também para os CpGs 12 a 30 (Figura 21). Em conjunto esses resultados mostram a interação entre metilação do DNA e modificações de histonas na regulação do gene *MMP9* em câncer de mama. Além disso observamos que de fato ocorre a correlação entre a desmetilação do DNA nos CpGs 12 a 30 e a marca de histona H3K4me3 o que pode indicar presença de um sítio ativador de transcrição ou um sítio para produção de transcrito alternativo neste local.

Concluindo, nossos resultados mostram que a metilação do DNA na região promotora e no corpo do gene aumentam a expressão do gene *MMP9* em câncer de mama em conjunto com marca de abertura de cromatina. Além disso, o uso do agente desmetilante 5-azadC que vem sendo amplamente utilizado na terapia de diversos tipos de leucemias e síndrome mielodisplásica, foi capaz de ativar o gene *MMP9* em linhagens tumorais de mama. O uso clínico deste medicamento não mostrou até o momento tais prováveis efeitos colaterais devido aos modelos de amostragem utilizados. O estudo avançado

do uso destes medicamentos desmetilantes pode ser um grande desafio porque por um lado o efeito de ativação de supressores de tumor pode ser de fato alcançado (Cheishvili *et al.*, 2015). Porém a ativação de oncogenes como *MMP9* precisa ser estudada e assim avaliados os efeitos futuros do uso desse medicamento em termos de metástases.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados nos permitem concluir que o gene *MMP9* é regulado por metilação do DNA na região promotora e no corpo do gene em um local específico entre os CpGs 12 a 30 na região (4007 - 4247) em câncer de mama. Além disso, essa região específica também é passível de ativação por marca de abertura de cromatina representada pelo aumento significativo de H3K4me3. Estes eventos epigenéticos não haviam ainda sido descritos e podem auxiliar no entendimento do funcionamento de regiões intragênicas e sua complexidade na regulação da expressão gênica.

Além disso, destacamos que o uso do medicamento decitabine pode ativar o gene *MMP9* promovendo assim a expressão de um gene potencialmente envolvido com metástases. Estudos clínicos mais detalhados devem ser conduzidos em testes a longo prazo, para certificar-se de que o uso dessa droga em terapia anti-câncer não venha a disparar o aparecimento tardio de metástases.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIUS-LINDGREN, M. et al. The RECK gene and biological malignancy--its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. **Anticancer Res**, v. 34, n. 8, p. 3867-73, Aug 2014. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075007> >.

ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 8, p. 1647-58, Aug 2003. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14504655 >.

BAKER, A. H.; AHONEN, M.; KAHARI, V. M. Potential applications of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) overexpression for cancer gene therapy. **Adv Exp Med Biol**, v. 465, p. 469-83, 2000. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810650> >.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.

BAYLIN, S. B. et al. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer Res**, v. 46, n. 6, p. 2917-22, Jun 1986. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3009002> >.

BERNAL, T. et al. Effects of azacitidine on matrix metalloproteinase-9 in acute myeloid leukemia and myelodysplasia. **Exp Hematol**, v. 41, n. 2, p. 172-9, Feb 2013. ISSN 1873-2399 (Electronic) 0301-472X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23085464> >.

BERNARDO, M. M.; FRIDMAN, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. **Biochem J**, v. 374, n. Pt 3, p. 739-45, Sep 15 2003. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755684> >.

BERNSTEIN, B. E. et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 13, p. 8695-700, Jun 25 2002. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060701> >.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 16, p. 2395-402, Oct 2000. ISSN 0964-6906 (Print)
 0964-6906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005794> >.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 1 2002. ISSN 0890-9369 (Print)
 0890-9369 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782440> >.

BODEY, B. et al. Molecular biological ontogenesis of the thymic reticulo-epithelial cell network during the organization of the cellular microenvironment. **In Vivo**, v. 13, n. 3, p. 267-94, May-Jun 1999. ISSN 0258-851X (Print)
 0258-851X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10459506> >.

CATHCART, J.; PULKOSKI-GROSS, A.; CAO, J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. **Genes Dis**, v. 2, n. 1, p. 26-34, Mar 1 2015. ISSN 2352-3042 (Print). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097889> >.

CHAKRABORTI, S. et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol Cell Biochem**, v. 253, n. 1-2, p. 269-85, Nov 2003. ISSN 0300-8177 (Print)
 0300-8177 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14619979> >.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. S37-43, Nov 2001. ISSN 0962-8924 (Print)
 0962-8924 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684441> >.

CHEISHVILI, D.; BOUREAU, L.; SZYF, M. DNA demethylation and invasive cancer: implications for therapeutics. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 11, p. 2705-15, Jun 2015. ISSN 1476-5381 (Electronic)
 0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134627> >.

CHERNOV, A. V. et al. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. **J Biol Chem**, v. 284, n. 19, p. 12727-34, May 8 2009. ISSN 0021-9258 (Print)
 0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286653> >.

CHICOINE, E. et al. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 297, n. 4, p. 765-72, Oct 4 2002. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359218> >.

CHIK, F.; SZYF, M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 2, p. 224-32, Feb 2011. ISSN 1460-2180 (Electronic) 0143-3334 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980350> >.

COCK-RADA, A. M. et al. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. **Cancer Res**, v. 72, n. 3, p. 810-20, Feb 1 2012. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194464> >.

CONSORTIUM, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57-74, Sep 6 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955616> >.

CORREA, T. C. et al. Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 1, p. 156-67, Sep 1 2006. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791855> >.

DAS, S. et al. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. **Life sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 467-76, Feb 27 2008. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243246> >.

DE LAUNOIT, Y. et al. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1766, n. 1, p. 79-87, Aug 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546322> >.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev**, v. 25, n. 10, p. 1010-22, May 15 2011. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576262> >.

DELPU, Y. et al. DNA Methylation and Cancer Diagnosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 15029-15058, Jul 2013. ISSN 1422-0067. Disponible em: <<Go to ISI>://WOS:000322171700122 >.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 1, p. 9-34, Mar 2006. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680569>
http://download.springer.com/static/pdf/287/art%3A10.1007%2Fs10555-006-7886-9.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs10555-006-7886-9&token2=exp=1462830630~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F287%2Fart%3A10.1007%2Fs10555-006-7886-9.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs10555-006-7886-9*~hmac=5dfcfc29ebdbd8dd5d2b1140d2d8fc15d3aba292c19483b49c6559c2934d9419>.

DESANTIS, C. E. et al. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 24, n. 10, p. 1495-506, Oct 2015. ISSN 1538-7755 (Electronic)
 1055-9965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26359465>>.

DION, M. F. et al. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 15, p. 5501-6, Apr 12 2005. ISSN 0027-8424 (Print)
 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795371>>.

DROOG, M. et al. Tamoxifen resistance: from bench to bedside. **Eur J Pharmacol**, v. 717, n. 1-3, p. 47-57, Oct 5 2013. ISSN 1879-0712 (Electronic)
 0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545365>>.

DUFFY, M. J. et al. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 2, n. 4, p. 252-7, 2000. ISSN 1465-5411 (Print)
 1465-5411 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250717>>.

DUFOUR, A. et al. Small-molecule anticancer compounds selectively target the hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9. **Cancer Res**, v. 71, n. 14, p. 4977-88, Jul 15 2011. ISSN 1538-7445 (Electronic)
 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646471>>.

EHRLICH, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5400-13, Aug 12 2002. ISSN 0950-9232 (Print)
 0950-9232 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154403>>.

EHRLICH, M.; LACEY, M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. **Epigenomics**, v. 5, n. 5, p. 553-68, 2013. ISSN 1750-192X (Electronic)
 1750-192X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059801>>.

ESTEVE, P. O. et al. Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. **J Biol Chem**, v. 277, n. 38, p. 35150-5, Sep 20 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130632> >.

FALZONE, L. et al. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. **Aging (Albany NY)**, v. 8, n. 5, p. 933-44, May 2016. ISSN 1945-4589 (Electronic)

1945-4589 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27115178> >.

FANJUL-FERNANDEZ, M. et al. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 1, p. 3-19, Jan 2010. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631700> >.

FARINA, A. R.; MACKAY, A. R. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 240-96, 2014. ISSN 2072-6694 (Electronic)

2072-6694 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473089> >.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, n. 5895, p. 89-92, Jan 6 1983. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6185846> >.

FIGUEIRA, R. C. et al. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC Cancer**, v. 9, p. 20, 2009. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144199> >.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, v. 196, n. 2, p. 261-82, Jul 20 1987. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3656447> >.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER, C. et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncol**, v. 1, n. 4, p. 505-27, Jul 1 2015. ISSN 2374-2445 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181261> >.

GLOBOCAN. Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer. p. <
http://www.globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>, 2012.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635-8, Feb 23 2007. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320500> >.

GOMEZ, D. E. et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur J Cell Biol**, v. 74, n. 2, p. 111-22, Oct 1997. ISSN 0171-9335 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352216> >.

GREGER, V. et al. Epigenetic Changes May Contribute to the Formation and Spontaneous Regression of Retinoblastoma. **Human Genetics**, v. 83, n. 2, p. 155-158, Sep 1989. ISSN 0340-6717. Disponible em: < <Go to ISI>://A1989AQ15600011 >.

GRONBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, v. 115, n. 10, p. 1039-59, Oct 2007. ISSN 0903-4641 (Print) 0903-4641 (Linking). Disponible em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18042143 >.

GUM, R. et al. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. **Oncogene**, v. 14, n. 12, p. 1481-1493, Mar 27 1997. ISSN 0950-9232. Disponible em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WT58400011 >.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 32-42, Jan 2009. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking). Disponible em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19065135 >.

HAMM, C. A.; COSTA, F. F. Epigenomes as therapeutic targets. **Pharmacol Ther**, v. 151, p. 72-86, Jul 2015. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25797698> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HATZIAPOSTOLOU, M.; ILIOPOULOS, D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 10, p. 1681-702, May 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21249513> >.

HEBBES, T. R.; THORNE, A. W.; CRANE-ROBINSON, C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. **EMBO J**, v. 7, n. 5, p. 1395-402, May 1988. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3409869> >.

HERVOUET, E. et al. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. **Epigenetics**, v. 8, n. 3, p. 237-45, Mar 2013. ISSN 1559-2308 (Electronic)
1559-2294 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364277> >.

HU, C. P. et al. Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP activity by overexpression of TGF-beta1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 3, p. H1833-8, Sep 2007. ISSN 0363-6135 (Print)
0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586616> >.

HUHTALA, P. et al. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 25, p. 16485-90, Sep 5 1991. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653238> >.

INCA, I. N. D. C. Estimativa de cancer no Brasil 2014.
, p. <<http://www.inca.gov.br>>, 2016.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-80, Aug 10 2001. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11498575 >.

JERONIMO, C. et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 22, p. 1747-52, Nov 21 2001. ISSN 0027-8874 (Print)
0027-8874 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11717336 >.

KANG, H. G. et al. RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. **J Orthop Res**, v. 25, n. 5, p. 696-702, May 2007. ISSN 0736-0266 (Print)
0736-0266 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17262820> >.

KLEIN, A. et al. Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes. **Cancer Lett**, v. 276, n. 2, p. 212-20, Apr 18 2009. ISSN 1872-7980 (Electronic)

0304-3835 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114293>>.

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct 4 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309446800032 >.

KOTURBASH, I. et al. microRNAs as pharmacogenomic biomarkers for drug efficacy and drug safety assessment. **Biomark Med**, v. 9, n. 11, p. 1153-76, Nov 2015. ISSN 1752-0371 (Electronic)
 1752-0363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501795>>.

KULIS, M. et al. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 11, p. 1161-74, Nov 2013. ISSN 0006-3002 (Print)
 0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938249>>.

LABRIE, M.; ST-PIERRE, Y. Epigenetic regulation of mmp-9 gene expression. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 17, p. 3109-24, Sep 2013. ISSN 1420-9071 (Electronic)
 1420-682X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184252>>.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 3 1993. ISSN 0092-8674 (Print)
 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>>.

LEE, Y. T. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. **J Surg Oncol**, v. 23, n. 3, p. 175-80, Jul 1983. ISSN 0022-4790 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6345937>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)
 1046-2023 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>.

LOFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 1, p. 191-208, Jul 2011. ISSN 0903-1936. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292247700028 >.

MALVEZZI, M. et al. European cancer mortality predictions for the year 2012. **Ann Oncol**, v. 23, n. 4, p. 1044-52, Apr 2012. ISSN 1569-8041 (Electronic)
 0923-7534 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22373539>>.

MASURE, S. et al. Human hepatoma cells produce an 85 kDa gelatinase regulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. **Biochim Biophys Acta**, v. 1054, n. 3, p. 317-25, Sep 24 1990. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2169896> >.

MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, n. 42, p. 6479-83, Sep 29 2003. ISSN 0950-9232 (Print). Disponible em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14528271 >.

MORRISSEY, C. et al. The biology and clinical implications of prostate cancer dormancy and metastasis. **J Mol Med (Berl)**, v. 94, n. 3, p. 259-65, Mar 2016. ISSN 1432-1440 (Electronic)

0946-2716 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26489605> >.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb 15 2006. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405877> >.

NIE, J. et al. Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors. **Cancer Lett**, v. 354, n. 1, p. 12-20, Nov 1 2014. ISSN 1872-7980 (Electronic)

0304-3835 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130173> >.

NODA, M. et al. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev**, v. 22, n. 2-3, p. 167-75, Jun-Sep 2003. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12784995> >.

NODA, M.; TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer Sci**, v. 98, n. 11, p. 1659-65, Nov 2007. ISSN 1349-7006 (Electronic)

1349-7006 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17725805> >.

OH, J. et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789-800, Dec 14 2001. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747814> >.

OHL, F. et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? **J Mol Med (Berl)**, v. 83, n. 12, p. 1014-24, Dec 2005. ISSN 0946-2716 (Print)

0946-2716 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211407> >.

OMS. World Health Organization. p. <<http://www.who.int/en/>>, 2014.

OMURA, A. et al. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. **J Biol Chem**, v. 284, n. 6, p. 3461-9, Feb 6 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022775>>.

OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 657-672, Sep 2002. ISSN 1474-175x. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511112>>.

PAGE-MCCAW, A. Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. **Semin Cell Dev Biol**, v. 19, n. 1, p. 14-23, Feb 2008. ISSN 1084-9521 (Print) 1084-9521 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17702617>>.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 6, p. 448-56, Jun 2004. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170447>>.

PARK, L. S. et al. Time trends in cancer incidence in persons living with HIV/AIDS in the antiretroviral therapy era: 1997-2012. **AIDS**, Apr 8 2016. ISSN 1473-5571 (Electronic) 0269-9370 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27064994>>.

PATIL, V.; WARD, R. L.; HESSON, L. B. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 823-8, Jun 2014. ISSN 1559-2308 (Electronic) 1559-2294 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717538>>.

PEREIRA, I. T. et al. Fibronectin affects transient MMP2 gene expression through DNA demethylation changes in non-invasive breast cancer cell lines. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e105806, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25208219>>.

PESTA, M. et al. Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. **Anticancer Res**, v. 29, n. 11, p. 4535-9, Nov 2009. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032402>>.

PROVATOPOULOU, X. et al. Circulating levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and their complex MMP-

9/NGAL in breast cancer disease. **BMC Cancer**, v. 9, p. 390, 2009. ISSN 1471-2407 (Electronic)
1471-2407 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889214> >.

QUARANTA, M. et al. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. **Anticancer Res**, v. 27, n. 5B, p. 3593-600, Sep-Oct 2007. ISSN 0250-7005 (Print)
0250-7005 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972522> >.

RADEMACHER, K. et al. Evolutionary origin and methylation status of human intronic CpG islands that are not present in mouse. **Genome Biol Evol**, v. 6, n. 7, p. 1579-88, Jul 2014. ISSN 1759-6653 (Electronic)
1759-6653 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24923327> >.

RADISKY, E. S.; RADISKY, D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 201-12, Jun 2010. ISSN 1573-7039 (Electronic)
1083-3021 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20440544 >.

REHMAN, A. A.; AHSAN, H.; KHAN, F. H. alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 8, p. 1665-75, Aug 2013. ISSN 1097-4652 (Electronic)
0021-9541 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086799> >.

ROACH, H. I. et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 10, p. 3110-24, Oct 2005. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200590> >.

ROOMI, M. W. et al. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. **Oncol Rep**, v. 21, n. 5, p. 1323-33, May 2009. ISSN 1021-335X (Print)
1021-335X (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360311> >.

SATO, H.; SEIKI, M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. **Oncogene**, v. 8, n. 2, p. 395-405, Feb 1993. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8426746> >.

SATO, N. et al. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 4, p. 327-30, Feb 19 2003. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591989> >.

SCHULER, S. L. et al. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 32, n. 2, p. 184-9, Mar-Apr 2008. ISSN 0148-6071 (Print)

0148-6071 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407912> >.

SHENKER, N.; FLANAGAN, J. M. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. **Br J Cancer**, v. 106, n. 2, p. 248-53, Jan 17 2012. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166804> >.

SHENKER, N. S. et al. Transcriptional implications of intragenic DNA methylation in the oestrogen receptor alpha gene in breast cancer cells and tissues. **BMC Cancer**, v. 15, p. 337, 2015. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25927974> >.

SHIMAJIRI, S. et al. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. **FEBS Lett**, v. 455, n. 1-2, p. 70-4, Jul 16 1999. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428474> >.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, Jan 2005. ISSN 0736-6205. Disponible em: < <Go to ISI>://WOS:000226421900018 >.

SONG, S. Y. et al. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 1, p. 101-8, Jan 2006. ISSN 0959-8049 (Print)

0959-8049 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16324834> >.

SOPATA, I.; DANCEWICZ, A. M. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 370, n. 2, p. 510-23, Dec 29 1974. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4216367> >.

SPAN, P. N. et al. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2710-5, Jun 1 2003. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543X (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767082> >.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 10, n. 6, p. 415-33, Dec 2000. ISSN 1044-579X (Print)

1044-579X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170864> >.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001. ISSN 1081-0706 (Print)

1081-0706 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687497> >.

STRESEMANN, C.; LYKO, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. **Int J Cancer**, v. 123, n. 1, p. 8-13, Jul 1 2008. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425818> >.

SUBRAMANIAM, D. et al. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Front Oncol**, v. 4, p. 80, 2014. ISSN 2234-943X (Electronic)

2234-943X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24822169> >.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, n. 5, p. 725-37; quiz 738-40, Nov 2008. ISSN 1097-6787 (Electronic)

0190-9622 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19119093> >.

TAKAHASHI, C. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 22, p. 13221-6, Oct 27 1998. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789069> >.

TALVENSAARI-MATTILA, A.; PAAKKO, P.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. **Br J Cancer**, v. 89, n. 7, p. 1270-5, Oct 6 2003. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14520459> >.

TEPERINO, R.; LEMPRADL, A.; POSPISILIK, J. A. Bridging epigenomics and complex disease: the basics. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 9, p. 1609-21, May 2013. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463237> >.

TORRES, I. O.; FUJIMORI, D. G. Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation. **Curr Opin Struct Biol**, v. 35, p. 68-75, Oct 19 2015. ISSN 1879-033X (Electronic)

0959-440X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26496625> >.

TOTH, M.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9 by Gelatin Zymography. **Methods in molecular medicine**, v. 57, p. 163-74, 2001. ISSN 1543-1894 (Print)

1543-1894 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340898> >.

TROMBETTA-LIMA, M. et al. Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33120-33, Oct 20 2015. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26431549> >.

TURNER, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. **Bioessays**, v. 22, n. 9, p. 836-45, Sep 2000. ISSN 0265-9247 (Print)

0265-9247 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10944586 >.

UMLAUF, D.; GOTO, Y.; FEIL, R. Site-specific analysis of histone methylation and acetylation. **Methods Mol Biol**, v. 287, p. 99-120, 2004. ISSN 1064-3745 (Print)

1064-3745 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273407> >.

VANDOOREN, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 48, n. 3, p. 222-72, May-Jun 2013. ISSN 1549-7798 (Electronic)

1040-9238 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547785> >.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol**, v. 3, n. 12, p. 755-63, Dec 2002. ISSN 1470-2045 (Print)

1470-2045 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473517> >.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, Aug 2005. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056258> >.

WELM, B.; MOTT, J.; WERB, Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. **Curr Biol**, v. 12, n. 6, p. R209-11, Mar 19 2002. ISSN 0960-9822 (Print)

0960-9822 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909548> >.

WILLIAMS, K.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? **Embo Reports**, v. 13, n. 1, p. 28-35, Jan 2012. ISSN 1469-221x. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299166200011 >.

WOODCOCK, D. M.; CROWTHER, P. J.; DIVER, W. P. The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 145, n. 2, p. 888-94, Jun 15 1987. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3593377> >.

WOUTERS, B. J.; DELWEL, R. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 127, n. 1, p. 42-52, Jan 7 2016. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26660432> >.

YAN, C.; BOYD, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **Journal of cellular physiology**, v. 211, n. 1, p. 19-26, Apr 2007. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167774> >.

YAN, W. et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. **Brain Research**, v. 1411, p. 108-115, Sep 9 2011. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295111500011 >.

YANG, X. et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. **Cancer Cell**, v. 26, n. 4, p. 577-90, Oct 13 2014. ISSN 1878-3686 (Electronic) 1535-6108 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263941> >.

YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N. E. DNA methylation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 8, n. 2, p. 115-27, Jun 2001. ISSN 1351-0088 (Print) 1351-0088 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11446343> >.

YANG, X. J.; SETO, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5310-8, Aug 13 2007. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694074> >.

YOON, S.; EOM, G. H. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. **Chonnam Med J**, v. 52, n. 1, p. 1-11, Jan 2016. ISSN 2233-7385 (Print) 2233-7393 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865995> >.

ZHANG, D. et al. Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. **J Biol Chem**, v. 276, n. 5, p. 3683-90, Feb 2 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060286>>.

ZHOU, Y. et al. Modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in RAW264.7 cells by irradiation. **Mol Med Rep**, v. 3, n. 5, p. 809-13, Sep-Oct 2010. ISSN 1791-3004 (Electronic)

1791-2997 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21472318>>.